



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství**

**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Sledování nálezu makrotrombocytů v nátěru trombocytopenické  
periferní krve ve vztahu k rozšířenému parametru krevního obrazu-IPF  
(frakce nezralých trombocytů)**

**The surveillance of big platelets in peripheral thrombocytopenia in  
relation to widened parametr of the complete blood count-IPF  
(Immature Platelet Fraction).**

**Bakalářská práce**

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant  
Vedoucí práce: RNDr. Václava Mašková

**Filip Hechtberger**

---

**Kladno 2017**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2016/2017

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Filip Hechtberger**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Sledování nálezu makrotrombocytů v nátěru trombocytopenické periferní krve ve vztahu k rozšířenému parametru krevního obrazu-IPF (frakce nezralých trombocytů).**  
Téma anglicky: The surveillance of big platelets in peripheral thrombocytopenia in relation to widened parametr of the complete blood count-IPF (Immature Platelet Fraction).

### Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude zhodnocení významu rozšířeného parametru krevního obrazu IPF ve vztahu k nálezu velkých (mladých) trombocytů v mikroskopickém nátěru periferní krve. Automatický analyzátor krevního obrazu Sysmex XE-5000 nabízí při měření průtokovou cytometrií (FCM) v optickém kanálu parametr pro posouzení morfologie destiček - IPF, frakce nezralých destiček. Parametr IPF kvantifikuje frakci mladých trombocytů vztahenou k celkovému počtu PLT - odráží tedy reálnou trombopoézu. IPF parametr je měřený spolu s retikulocyty, a proto je někdy nesprávně nazýván jako tzv. retikulované destičky.  
Cíl BP:

U trombocytopenických vzorků periferní krve s naměřenou zvýšenou hodnotou parametru IPF zhodnotit morfologicky velikost destiček v mikroskopickém nátěru a stanovit orientační kritéria pro další diagnostickou rozvahu na základě parametru IPF v souvislosti s ostatními dostupnými laboratorními nálezy a vývojem klinického stavu pacienta.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Briggs C. et al., Performance evaluation of the Sysmex haematol, J.Clin.Pathol. 2012Nov, 65(11):1024-30.
- [2] Briggs.C. et al, Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation, Bone Marrow Transplant.2007 Apr, 39(8)501-7.
- [3] Penka M., Tesařová E a kol., Hematologie a transfúzní lékařství I, Praha, Grada , 2011

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: RNDr. Václava Mašková

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 31.10.2016

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Sledování nálezu makrotrombocytů v nátěru trombocytopenické periferní krve ve vztahu k rozšířenému parametru krevního obrazu-IPF (frakce nezralých trombocytů) vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů

V Kladně dne 15.05.2017

.....  
Filip Hechtberger

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěl nesmírně poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní RNDr. Václavě Maškové za její pomoc, cenné rady, poskytnuté znalosti a čas, který mi věnovala. Následně chci poděkovat paní Ing. Ludmile Landové, Ph.D. za její pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků. Dále bych rád poděkoval panu primáři plk. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D., že mi umožnil provádět práci na Oddělení hematologie a krevní transfuze v Ústřední vojenské nemocnici-Vojenské fakultní nemocnici Praha. Na závěr děkuji celému Oddělení hematologie a krevní transfuze za pomoc při provádění laboratorních měření a za poskytnuté studijní materiály k mé bakalářské práci.

## **Abstrakt**

Předmětem této práce bylo zhodnotit morfologicky velikost destiček v mikroskopickém nátěru ve vztahu k rozšířenému parametru krevního obrazu IPF (frakce nezralých trombocytů).

Z literatury víme, že sledováním IPF můžeme odlišovat poruchy megakaryopoézy (trombopoézy) od trombocytopenií ze zvýšené destrukce, konzumpce nebo ztráty krevních destiček nebo sekundárních, imunitně podmíněných trombocytopenií. Lze také monitorovat efekt terapie u trombocytopenií po transplantacích kmenových buněk nebo po chemoterapii.

Ke studii byly použity vybrané trombocytopenické vzorky periferní krve s naměřenými signifikantně zvýšenými hodnotami parametru IPF nad 8 %.

Primární naměřená data (PLT-O, IPF, RET a CRP) byla statisticky zpracována pomocí popisné (deskriptivní) statistiky. Pro posouzení korelací mezi těmito parametry byly použity Spearmanovy korelace.

Sledovali jsme, zdali existuje vztah mezi přítomností mladých destiček-makrotrombocytů (reálnou trombopoézou) a erytropoézou vyjádřenou počtem retikulocytů (RET).

Dále nás zajímala v literatuře někdy uváděná závislost mezi IPF a koncentrací C-reaktivního proteinu (CRP).

Na základě statistického vyhodnocení jsme vyslovili domněnku, že IPF je parametr zcela nezávislý na CRP a dalších parametrech měření krevního obrazu.

## **Klíčová slova**

Trombocyty; makrotrombocyty; IPF (frakce nezralých trombocytů); trombocytopenie; CRP (C-reaktivní protein); korelace; retikulocyty

## **Abstract**

This work main subject was to evaluate morphologically the size of platelets in microscopic blood smear in correlation to complete blood count parameter – IPF (Immature platelets fraction).

It is known fact that by observing IPF we are able to differentiate impaired megakaryopoiesis (thrombopoiesis), from thrombocytopenias caused by elevated destruction, consumption, loss of platelets or secondary thrombocytopenias related to immune system disorders. It is also possible to monitor the therapeutical effect in post stem – cell transplant thrombocytopenias or thrombocytopenias following chemotherapy.

Thrombocytopenic peripheral blood samples which were picked to measure, showed significant higher values of IPF, above 8%.

Primary measured data (PLT – 0, IPF, RTC and CRP) was statistically analysed by descriptive method. Spearman rank correlation test was used to show relations between those parameters.

We observed, whether some correlations could be established between young platelets – macrothrombocytes (real thrombopoiesis) and erythropoiesis measured by number of reticulocytes (RTC).

Further, we were interested in already published dependency of IPF and CRP (C-reactive protein).

Based on our statistic results we assumed that IPF is parameter absolutely independent from CRP as well as from the rest of measured complete blood count parameters.

**Key words:**

Platelets; macrothrombocytes; IPF (immature platelets fraction); thrombocytopenia; CRP (C – reactive protein); correlation; reticulocytes

## Obsah

1	Úvod .....	11
2	Současný stav .....	12
2.1	Krev.....	12
2.1.1	Rozdělení krve pro laboratorní vyšetření.....	12
2.1.2	Složení krve .....	13
2.1.3	Funkce krve .....	19
2.1.4	Hematopoéza (krvetvorba).....	20
2.2	Cévní systém.....	23
2.2.1	Krevní cévy .....	23
2.3	Hemostáza (srážení krve) .....	24
2.3.1	Primární hemostáza ve vztahu k trombocytu.....	25
2.4	Trombocyt (krevní destička) .....	28
2.4.1	Tvorba a vývoj trombocytů.....	28
2.4.2	Morfologie trombocytů .....	29
2.4.3	Funkce trombocytů .....	33
2.5	Vybrané sledované krevní parametry .....	33
2.5.1	IPF.....	33
2.5.2	CRP .....	34
2.6	Trombocytopenie .....	35
2.6.1	Druhy trombocytopenií.....	36
3	Cíl práce.....	41
4	Metodika .....	42



4.1	Definice souboru .....	42
4.1.1	Vzorky k měření .....	42
4.2	Přístroje.....	43
4.2.1	Nátěrový a barvicí automat Sysmex SP-1000i.....	43
4.2.2	Hematologický analyzátor Sysmex XE-5000.....	44
4.2.3	Zařízení na digitální morfologii Cella Vision DM 1200.....	47
4.2.4	Optický mikroskop .....	49
4.3	Metody.....	52
4.3.1	Odběr krve pro měření IPF, CRP .....	52
4.3.2	Stanovení CRP pomocí analyzátoru Roche Cobas c702. ....	53
4.3.3	Ruční zhotovení krevního nátěru .....	54
4.3.4	Strojový nátěr periferní krve.....	55
4.3.5	Panoptické barvení manuální.....	55
4.4	Postup měření.....	56
4.4.1	Měření krevního obrazu na analyzátoru Sysmex XE-5000 .....	56
4.4.2	Měření CRP na analyzátoru Roche cobas c702. ....	58
4.4.3	Zhotovení krevního nátěru pomocí SP-1000i.....	58
4.4.4	Morfologické hodnocení na zařízení pro digitální morfologii Cella Vision DM 1200 .....	59
4.4.5	Morfologické hodnocení na optickém mikroskopu .....	60
5	Výsledky.....	61
5.1	Výsledky měření .....	61
5.2	Statistické zpracování naměřených hodnot .....	68
5.2.1	Statistické zpracování PLT-O.....	71

5.2.2	Statistické zpracování IPF %.....	72
5.2.3	Statistické zpracování CRP .....	73
5.2.4	Statistické zpracování RTC abs .....	74
5.3	Spearmanovy korelace .....	75
5.3.1	Výsledné tabulky spearmanových korelací .....	76
6	Diskuze .....	77
7	Závěr .....	80
8	Seznam použitých zkratk.....	81
9	Seznam použité literatury.....	85
10	Seznam použitých obrázků .....	90
11	Seznam použitých tabulek.....	92
12	Seznam Příloh.....	93

# 1 ÚVOD

Práce se zabývá zhodnocením významu rozšířeného parametru krevního obrazu IPF % ve vztahu k nálezu velkých, mladých trombocytů v mikroskopickém nátěru periferní krve.

Tento parametr kvantifikuje procentuální frakci mladých trombocytů, která je vztažena k celkovému počtu PLT a odráží tak reálnou trombopoézu, může být též vhodný v některých případech pro zhodnocení prognózy a léčby trombocytopenií. Parametr IPF lze měřit na některých typech automatických analyzátorů krevního obrazu, např. Sysmex XE-5000 a to pomocí průtokové cytometrie (FCM).

Hodnota nad 6,1 % odráží snahu kostní dřeň kompenzovat nedostatek destiček v periferní krvi při probíhajícím onemocnění spojeném s destrukcí trombocytů (těžké záněty, polékové stavy, TTP, ITP, DIC, HUS aj.). Hodnocení megakaryopoézy prostřednictvím IPF může pomoci lékaři s rozhodnutím, kdy již může ukončit podávání trombokoncentrátu [48].

Naopak nález hodnoty pod 6,1 % bývá spojován s trombopoetickou dysfunkcí (dřeňovým útlumem) [21, 37].

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Krev

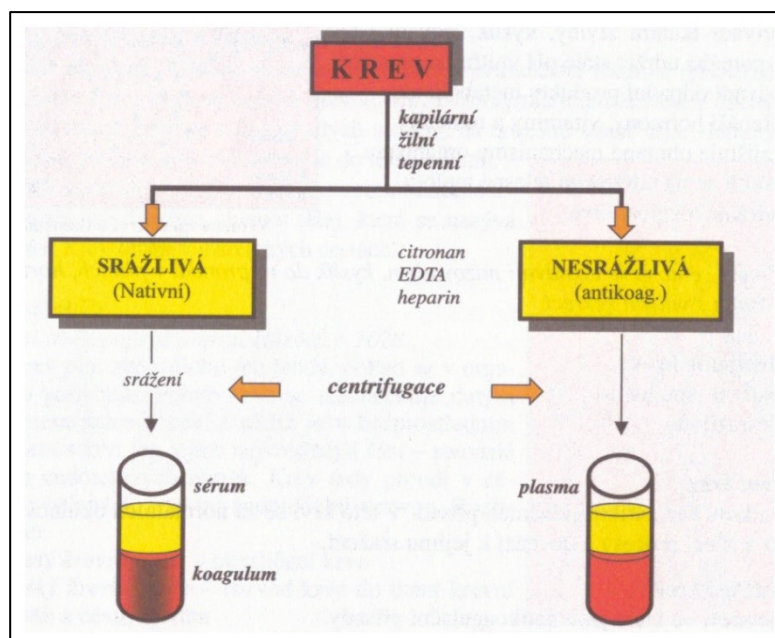
Krev je specializovaná tělní tekutina, červeného zbarvení (odkysličená krev bývá tmavší, okysličená světlejší), která proudí uzavřeným cévním systémem a zaujímá tak tvar prostředí ve kterém se právě nachází. Krev je nepostradatelným tekutým orgánem, který plní celou řadu vitálních funkcí, bez kterých by byl náš život nemožný [1].

#### 2.1.1 Rozdělení krve pro laboratorní vyšetření

Krev, odebranou na laboratorní vyšetření, rozdělujeme na dvě základní skupiny: nativní (srážlivou) a nesrážlivou [1].

Pokud mluvíme o krvi nativní (srážlivé), jedná se o krev bez antikoagulačních přísad, kdy se v krvi za normálních okolností aktivují srážecí procesy a dojde k jejímu přirozenému srážení. V případě, že mluvíme o krvi nesrážlivé, jedná se o krev, ke které po odběru přidány antikoagulační přísady a k procesu srážení nedochází [1].

Jednotlivá krevní rozdělení můžeme vidět na obrázku 1.



Obrázek 1 Rozdělení krve [1]

Podle místa odběru se krev rozděluje na kapilární, žilní a arteriální. Kapilární krev bývá odebírána lancetou, speciální nádobkou či kapilárou. Žilní krev se odebírá vakuovým či pístovým uzavřeným systémem. Arteriální krev se naproti tomu odebírá zavedenou kanylou přímo z tepny [1].

### 2.1.2 Složení krve

Samotná krev se skládá z buněčných elementů, které jsou rozptýleny v tekutém buněčném médiu-tzv. plazmě. Plazma zaujímá zhruba 55% z celkového objemu krve, zbylých 45% objemu tvoří takzvaně buněčná složka [1].

Je známo, že na každý 1 kg lidské hmotnosti připadá 70-75 ml krve. U malých dětí to bývá o něco více, tedy přibližně 80-85 ml, což z celkové váhy člověka představuje asi 1/13 (7-8 %). Dospělý člověk má tedy průměrně 5 litrů krve a z tohoto množství tvoří přibližně 55-60 % plazma a 40-45% erytrocyty [1].

### 2.1.2.1 Plazma

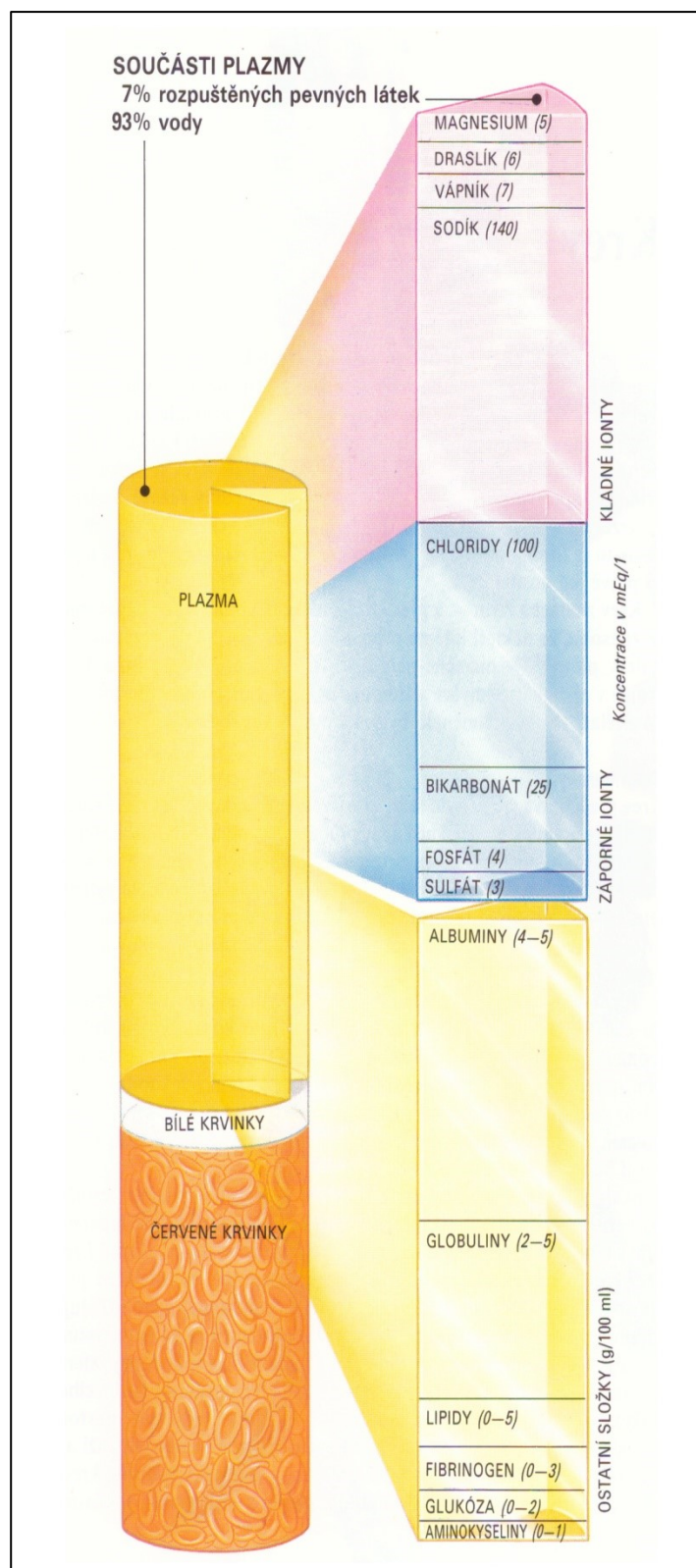
Plazma je obvykle světle žlutá průhledná, lehce zakalená tekutina, tvořící většinou 55 % objemu krve. V plazmě se pohybují buňky řady červené, bílé a krevní destičky. Za patologických stavů se do periferní krve mohou vyplavovat z kostní dřeně i jiné typy buněk - nezralé formy [1].

Plazma se získává centrifugací (stáčením) nesrážlivé krve pomocí centrifugy [1].

Samotnou plazmu tvoří 92 %  $H_2O$ , 7% bílkovin a 1% anorganických a organických látek [1].

Za specifických okolností může být plazma lehce zakalená, což bývá způsobeno zvýšeným obsahem tukových látek (po jídle nebo při poruchách metabolismu), poté se jí říká plazma chylózní, žlutě zbarvená (ikterická) nebo červeného zbarvení (hemolytická) [1].

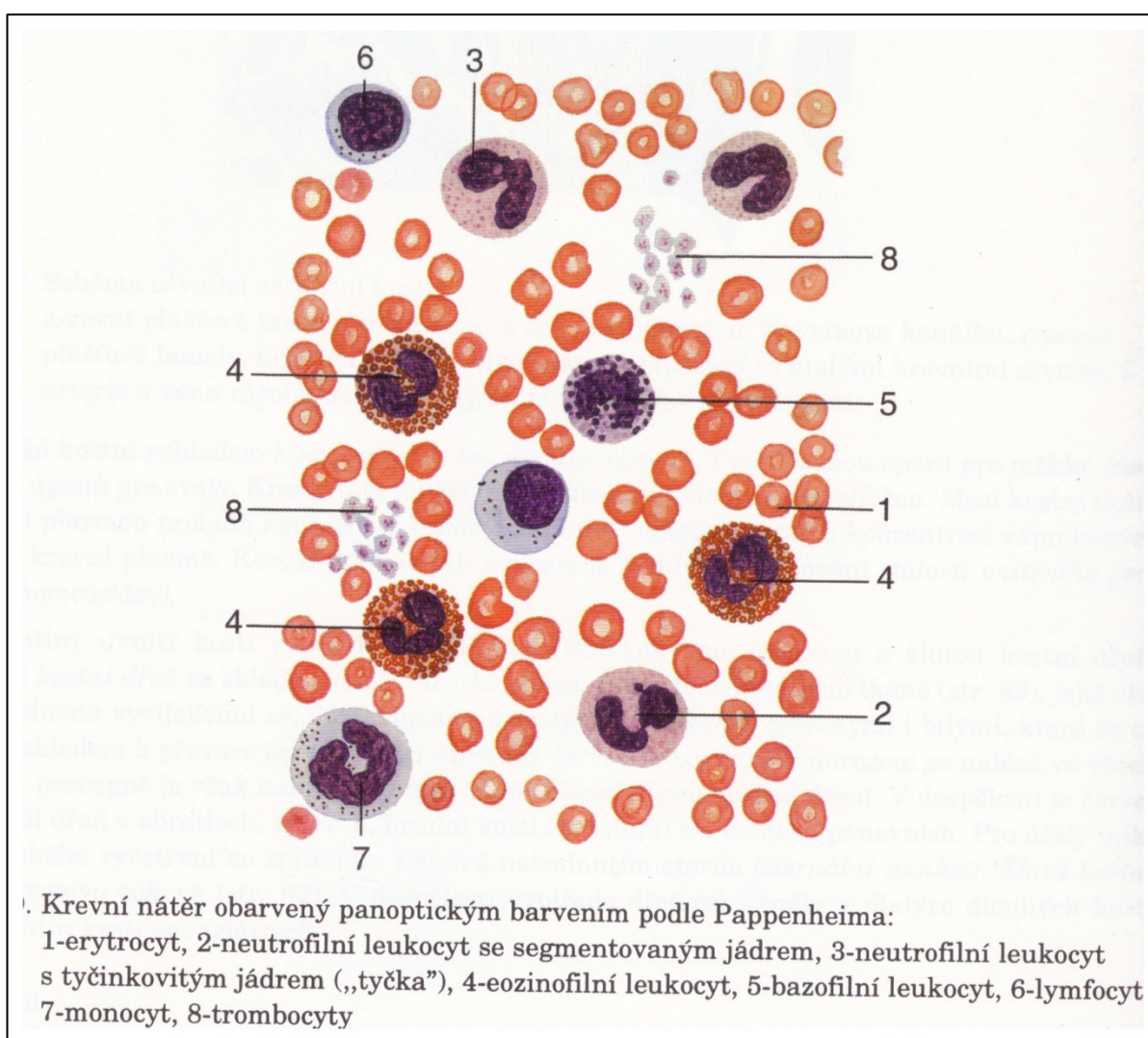
Na obrázku 2 můžeme vidět jednotlivé rozložení pevných látek, které jsou součástí plazmy.



Obrázek 2 Součásti plazmy[10]

### 2.1.2.2 Buněčné složky krve

Buněčné složky krve či buněčné elementy jsou přítomny v plazmě. Do této skupiny můžeme zařadit červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty) [1]. Na obrázku 3 můžeme vidět tvary a uspořádání jednotlivých krvinek a destiček, které vychází z panoptického barvení podle Pappenheima [16].



Obrázek 3 Znáznornění tvarů a uspořádání jednotlivých krevních buněk z krevního nátěru, obarveného panoptickým barvením[16]



- **Červené krvinky**

Označení červené krvinky neboli erytrocyty pochází z řeckého *erythros* = červený a *kýtos* = buňka [1].

Červené krvinky jsou bezjaderné buňky, které jsou nejpočetněji zastoupeny v lidské krvi, za normálních okolností zaujímají 40-45% objemu krve [3].

Jejich počet bývá u muže  $5 \cdot 10^{12}/l$ , u ženy  $4,5 \cdot 10^{12}/l$ . [3] Považují se za buňky neúplné, jelikož neobsahují většinu nitrobuněčných organel. Jejich hlavní funkcí je přenos  $O_2$  z plic do tkání a přenos  $CO_2$  opačným směrem. Tuto funkci zprostředkovává hemoglobin, který spolu s velkým počtem erytrocytů v krvi způsobuje její typické zbarvení [2].

- **Bílé krvinky**

Označení bílé krvinky neboli leukocyty pochází z řeckého *leukos* = bílý a *kýtos* = buňka [1].

Bílé krvinky jsou bezbarvé kulovité buňky, na rozdíl od erytrocytů obsahující jádro [2]. Jejich počet v jednom litru krve se pohybuje v rozmezí od  $4 \cdot 10^9$  -  $10 \cdot 10^9$ . Počet leukocytů se zvyšuje při infekcích, zánětech, nádorových a jiných onemocnění. Funkcí leukocytů je účast na obranných reakcích, ke které využívají schopnost fagocytózy anebo tvorby protilátek [1, 3].

Za normálních okolností můžeme tedy najít v periferní (obvodové) krvi tyto krvinky: neutrofilní tyče, neutrofilní segmenty, eozinofilní segmenty, bazofilní segmenty, monocyty, lymfocyty a krevní destičky (trombocyty) [2].

Buňky můžeme tedy rozdělit jak morfologicky, tak funkčně. U morfologického dělení se nahlíží na přítomnost, či nepřítomnost granulí (specifických) v cytoplazmě a rozdělujeme je na granulocyty a agranulocyty. Do skupiny agranulocytů (mononukleáry) patří lymfocyty a monocyty. Granulocyty (polymorfonukleáry) jsou neutrofilní, eozinofilní a bazofilní [2]. Hlavní funkcí granulocytů je fagocytóza, což znamená pohlcování bakterií a jiných cizorodých partikulí, které mohou vniknout do organismu [3].

### **Lymfocyty**

Lymfocyt patří mezi druhou nejpočetnější skupinu leukocytů, které mají velký význam v imunitním systému lidského organismu. Jejich počet se pohybuje za normálního stavu mezi 20-40 % [3].

### **Monocyty**

Monocyty jsou nezralé krevní buňky, u kterých dochází k přeměně na makrofágy. Jsou přítomny v místě, kde je větší pravděpodobnost vzniku infekce. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza. Jejich počet se pohybuje od 1-8% [3].

### **Neutrofilní granulocyty**

Neutrofilní granulocyty bývají nejpočetnější (50-70 %), jsou jakousi první obrannou linií těla proti vzniklým bakteriím, které rovněž fagocytují [3].

### **Eosinofilní granulocyty**

Eosinofilní granulocyty se uplatňují při alergických a parazitárních onemocněních. Jejich zastoupení v periferní krvi běžně činí 1-9% [3].

## Bazofilní granulocyty

Bazofilní granulocyty produkují v granulích látky – histamin a serotonin, jež se po vazodilataci projevují především při alergických a antiparazitárních reakcích organismu. Jejich počet činí 0,5 % [3].

- **Trombocyty**

Označení krevní destičky neboli trombocyty pochází z řeckého *thrombos* = sraženina (sedlina) a *kýtos* = buňka [1].

Krevní destičky, které jsou nejmenšími částicemi v krvi, mohou nabývat různých tvarů (světlolomný okrouhlý nebo protáhlý diskoidní), velikostí a hustot. Jejich počet v krvi čítá  $150-400 \cdot 10^9/l$  a tento počet bývá stejný u novorozenců, dětí i dospělých. Trombocyty produkují látky, které jsou důležité pro stimulaci i kontrolu hemostázy [4].

### 2.1.3 Funkce krve

Jak již bylo zmíněno, krev je nepostradatelnou součástí lidského těla a plní celou řadu vitálních funkcí, které jsou zajišťovány jednotlivými složkami, ze kterých je krev složena.

Mezi hlavní funkce krve můžeme zařadit následující úkoly:

- Přenos  $O_2$ ,  $CO_2$  a dalších plynů (pomocí erytrocytů).
- Transport živin, elektrolytů, vitamínů i produktů lidského metabolismu po těle.
- Zprostředkování přenosu hormonů (signálních molekul).
- Oteplování či ochlazování tělesné teploty.

- Pufrování (zachování stabilního pH).
- Obranné (imunitní) reakce proti mikroorganismům, cizorodým látkám a částicím (pomocí leukocytů) a další [5].

#### **2.1.4 Hematopoéza (krvetvorba)**

Proces hematopoézy neboli krvinek je velmi komplikovaný a představuje děj, kdy dochází k tvorbě krvinek v krvinek v krvinek [11].

Krvetvorba je komplexně řízený děj, který není dodnes zcela prozkoumán. Bývá popisována jako plynulý, rovnoměrný a neustálý děj, který v případě snížené tvorby vypovídá, že pacient trpí nějakým onemocněním [11].

Krvetvorba má dvě fáze a to: prenatální (předporodní) a postnatální (porodní). [11].

#### **Vznik a vývoj krvinek**

Pro hematopoézu je důležitá přítomnost multipotentní kmenové buňky, která je buňkou výchozí a z ní se jednotlivé typy buněk (červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky) vyvíjejí. Multipotentní kmenová buňka se umí sebeobnovovat a diferenciovat do různých vývojových linií, které jsou základem pro tvorbu trombocytů, lymfocytů a erytrocytů [12].

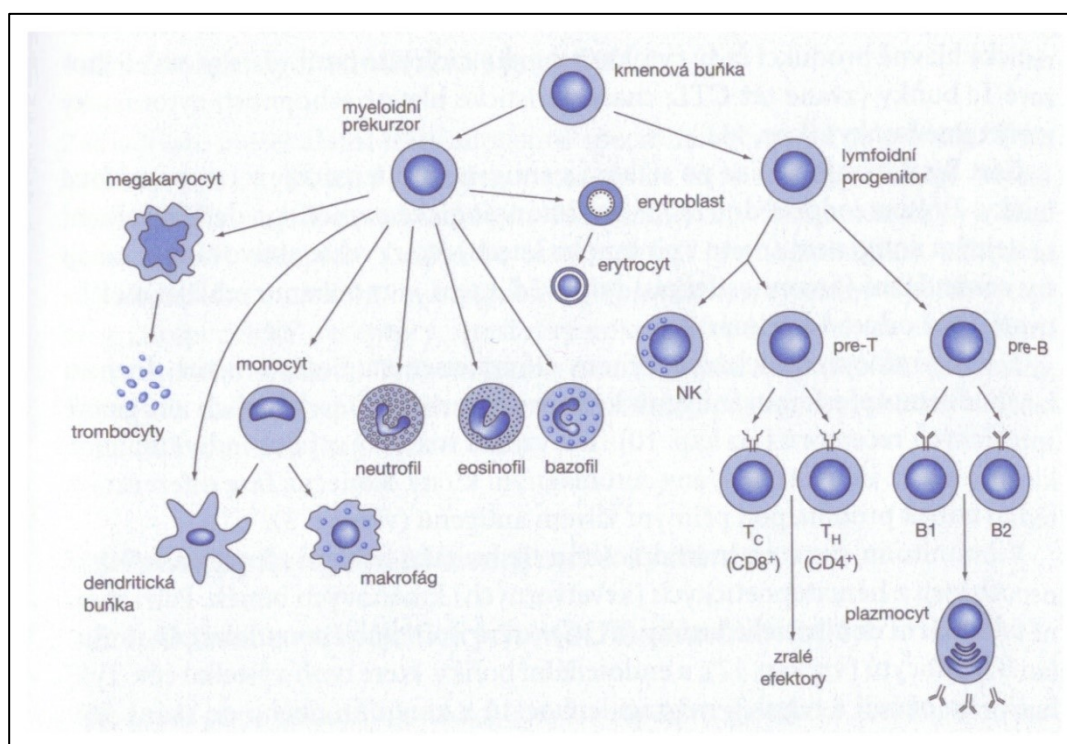
V lidské populaci je hematopoéza v embryonálním období lokalizována na povrch žloutkového vaku - prenatálně v mezoblastovém období (začíná 2 - 3 týden a končí až do cca 70. dne nitroděložního života). V následujícím hepatolienálním období (6. týden) jsou místem hematopoézy slezina a játra [12].

Ve fetálním období (20. týden) a po narození dítěte již probíhá hematopoéza ve všech kostech, respektive v kostní dřeni [12].

V dospělosti člověka- po dvacátém roku života ustává rozsah míst hematopoézy na červenou kostní dřeň obratlů, hrudní kosti, kostí pažních a kostí stehenních, což je způsobeno poklesem aktivity kostní dřene [12].

Kostní dřeň, která tvoří asi 3,4- 5,6 % lidské hmotnosti, produkuje  $200 \cdot 10^9$  erytrocytů,  $70 \cdot 10^9$  lymfocytů a  $100 \cdot 10^9$  trombocytů na 1 kg lidské hmotnosti a je zdrojem všech druhů krvinek, které cirkulují v lidské krvi [11].

Na obrázku 4 můžeme vidět diferenciaci různých druhů krvinek z kmenové buňky.



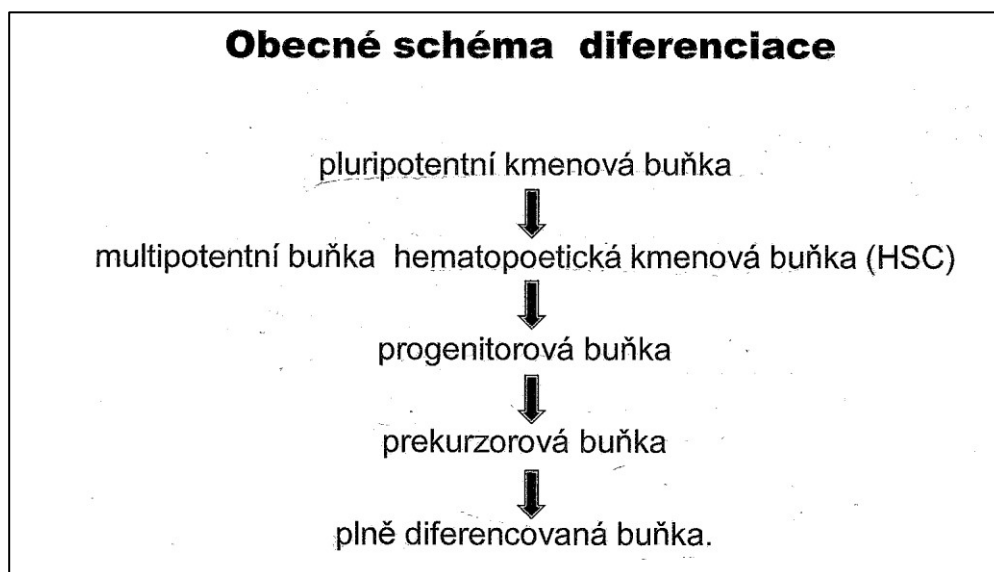
Obrázek 4 Diferenciace různých druhů krvinek z kmenové buňky[ 13]

V kostní dřeni je přítomna zásoba hemopoetických kmenových buněk, kdy hematopoetickými kmenovými buňkami jsou - „*pluripotentní kmenové buňky pro všechny řady nelymfoidní i lymfoidní, kmenová buňka pro lymfoidní řadu, multipotentní kmenová buňka pro všechny nelymfoidní řady CFU-GEMM (tzv. colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, monocytes / macrophages, megakaryocytes), zralejší kmenové buňky v podobě společných prekurzorů pro eritroidní a megakaryocytární linii a pro granulocytární / monocytární linii*“ [17 str. 15].

### Vývoj krevních buněk

Zralé krevní elementy se neustále musejí obnovovat, protože nemají schopnost dělení. Vznikající elementy procházejí třemi stádii a to: proliferací (dělením buněk), diferenciací (rozlišením) a maturací (zráním) [14].

Na obrázku 5 můžeme vidět obecné schéma diferenciaci.



Obrázek 5 Obecné schéma diferenciaci vznikajícího krevního elementu [14]

Tvorbu a vývoj krevních destiček nazýváme trombocytopoézou, tvorbu a vývoj erytrocytů erytropoézou a tvorbu a vývoj lymfocytů granulopoézou [15].

## 2.2 Cévní systém

Cévní systém je soustava, která je uzavřená a pod tlakem zde proudí krev, má funkci cirkulační a podílí se na hemostáze, tedy na zástavě krvácení [17]. Cévní systém můžeme rozdělit na dva základní okruhy – velký (systémový) a malý (plicní) oběh, který je poháněn jediným čerpadlem, tedy srdcem. Tento systém se skládá z cév, které rozvádějí krev (tepny, žíly, vlásečnice) a ze samotného srdce [18].

### 2.2.1 Krevní cévy

Krevní cévy můžeme rozdělit na tři skupiny- arterie (tepny), vény (žíly) a kapiláry (vlásečnice) [16].

Každá z těchto skupin má svou specifickou funkci, funkcí artérie je vedení krve ze srdce, funkcí vény je naproti tomu přívod krve do srdce. Obě tyto skupiny jsou propojené bohatou sítí kapilár, které plní funkci prostředníka pro výměnu látek a plynů mezi krví a tkáněmi [16].

Cévní stěny jsou tvořené ze tří vrstev-vnitřní, střední a zevní. Vnitřní vrstva je nazývána-tunica interna (intima), střední vrstva-tunica media (media) a zevní vrstva-tunica externa (adventitia) [19].

- **Vlásečnice (kapiláry)** – Stěna vlásečnic je tvořena jednou vrstvou plochých endotelových buněk, které nasedají na bazální membránu, k níž přiléhá velmi tenká vrstva složená z retikulárních vláken [16].

- **Žíly (vény)** – Žilní stěna se podobá stěně tepenné, která má tři vrstvy-intimu, medii a adventicii, avšak tato stěna je mnohem tenčí než u samotných tepen. Intimu tvoří endotel a tenká vrstva vaziva. Mediae je o mnoho tenčí než u tepen a je tvořena kolagenním vazivem, naproti tomu adventicie je tlustší než u tepen a je složena z vaziva kolagenního [16].
- **Tepny (arterie)** – Tepenná stěna je tvořena třemi vrstvami-intimou, medií a adventicií. Intima je tvořena vrstvičkou vaziva pokrytého endotelem, nasedající na bazální membránu. Mediae je tvořena buňkami hladkého svalu, kde mezi sloupci hladkého svalu je přítomné malé množství kolagenního vaziva. Adventicie je tvořena kolagenním vazivem a můžeme zde najít i vlákna elastická [16].

## 2.3 Hemostáza (srážení krve)

Hemostáza je komplexní proces, který má složitý mechanismus a v podstatě jde o schopnost organismu zastavovat krvácení [20]. Hemostatický systém je nezbytnou součástí oběhového systému a je nepostradatelný pro zachování lidského života, protože dokáže zastavovat krvácení pouze v místě poranění a pokud k poranění nedochází, tak krev neustále udržuje v tekutém stavu [20, 17].

Na zástavě krvácení se podílejí především následující složky:

- Cévy (endotel a subendotelové struktury cévní stěny).
- Trombocyty
- Tkáňová složka (uvolněná z poškozené tkáně).



- Činitelé plazmatického koagulačního systému (s aktivátory, inhibitory a složkami fibrinolýzy [20].

Do hemostázy bychom mohli v podstatě zahrnout všechny látky, které máme obsaženy v krvi a které jsou přichyceny na vnitřních stranách cév (erytrocyty, leukocyty, proteiny, lipidy, minerály atp.) [17].

Pokud interagují všechny složky hemostatického systému, výsledkem je lokální ucpání otvoru v cévě. Takto poraněná céva se nejprve zúží, trombocyty během 2-4 minut otvor zalepí a pomocí koagulačního systému se vytvoří pevná fibrinová sraženina. U sraženiny dojde k retrakci a vytvoří se tzv. stabilní fibrinová zátka [5].

### **2.3.1 Primární hemostáza ve vztahu k trombocytu**

Pokud mluvíme o primární hemostáze, tak hovoříme o procesu tvorby primární hemostatické zátky. Hemostatická zátka zastavuje krvácení, tím že uzavírá část, kde byla cévní stěna narušena [20].

Primární hemostázy se zúčastňují dvě základní složky hemolytického systému- krevní destičky (trombocyty) a cévní složka (céva) [20].

#### **2.3.1.1 Průběh tvorby primární destičkové zátky**

Krevní destičky nereagují na nenarušenou (nezměněnou) endotelovou část cévní stěny a jako neaktivní destičky zaujímají diskoidní tvar [20].

V momentě kdy dojde k poškození endotelové vrstvy, které může být způsobeno poraněním, zánětem nebo degenerativním procesem, dochází k odkrytí pojivové tkáně, která se nalézá právě pod touto endotelovou vrstvou. V místě poškození se odkryjí kolagenní vlákna a nastane **adheze** [20].

**Adheze** je v podstatě přichycení trombocytů na kolagenová vlákna prostřednictvím receptorů glykoproteinové povahy (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX) a jejich spojení je zaručeno bivalentními proteiny (vWF) [20].

**Adheze trombocytů** spolu s **aktivací receptorů** navozuje – **aktivaci krevních destiček** (kaskáda pochodů biochemické a metabolické povahy). **Aktivace krevních destiček** je děj, u kterého nastává změna tvaru granulí, jejich centralizace a aktivace receptorů GP IIb/IIIa [20].

Následně dochází ke **kontaktu dalších destiček** pomocí mezibuněčných signálů, které mohou vzniknout díky granulím trombocytů, které umí vylučovat ADP (adenosindifosfát) a metabolismem kyseliny arachidonové poté vzniká TXA<sub>2</sub> (tromboxan 2) [20].

ADP a TXA<sub>2</sub> jsou aktivátory (urychlovači) **agregace krevních destiček**, váží se na receptory trombocytů, ty poté aktivují a po aktivaci mění svůj tvar na tvar **kulovitý s výběžky** [20].

Během této fáze dochází ke změně struktury, k aktivaci a odkrytí vazebných míst receptorů GP IIb/IIIa [20].

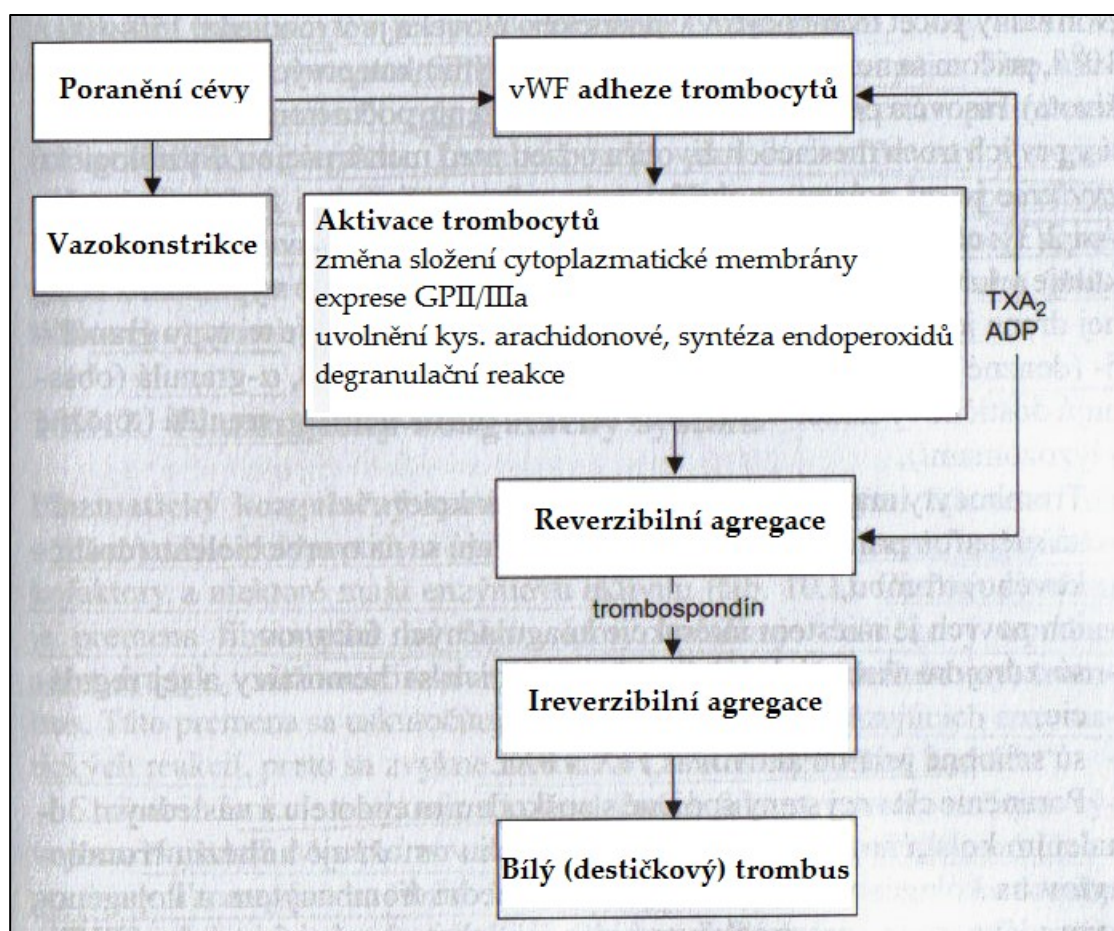
V následující části dochází k **agregaci** (tzv. vzájemnému pospojování krevních destiček). Nejdříve proběhne **primární agregace**, kterou vyvolává ADP, ten je uvolňován z porušovaných buněk a tkání [20].

Dále proběhne **sekundární agregace**, kterou vyvolávají proagregační působky (ADP a TXA<sub>2</sub>), které se uvolňují z trombotických granulí. Trombospondin, který se taktéž vylučuje z granulí trombocytů, vytváří stabilizující můstky mezi

trombocyty, a proto se **agregace** stává nevratnou. Agregace postupně propaguje (zesiluje) a nastává krok poslední [20].

Posledním krokem primární hemostázy je vytvoření **bílého trombu (destičkové zátky)** [20].

Na obrázku 6 můžeme vidět schéma primární hemostázy.



Obrázek 6 Schéma primární hemostázy. [Převzato a upraveno z 8]

## 2.4 Trombocyt (krevní destička)

### 2.4.1 Tvorba a vývoj trombocytů

Krevní destičky vznikají v kostní dřeni fragmentací neboli odštěpováním z periferní cytoplazmy megakaryocytů (mgk) [1].

Megakaryocyty jsou obrovské buňky, které se nedělí (pouze vyžívají), mívají 8-32 jader, vznikající opakovaným dělením jader (množením genomu  $2N-4N-6N-...$ ) bez dělení samotných buněk (endomitóza). Pro tvorbu megakaryocytů (mgk) je nepostradatelná nediferencovaná pluripotentní kmenová buňka (PKB), jejímž dělením a následnou diferenciací dochází ke vzniku základních souborů hematopoézy a to: erytropoézy a trombopoézy [17].

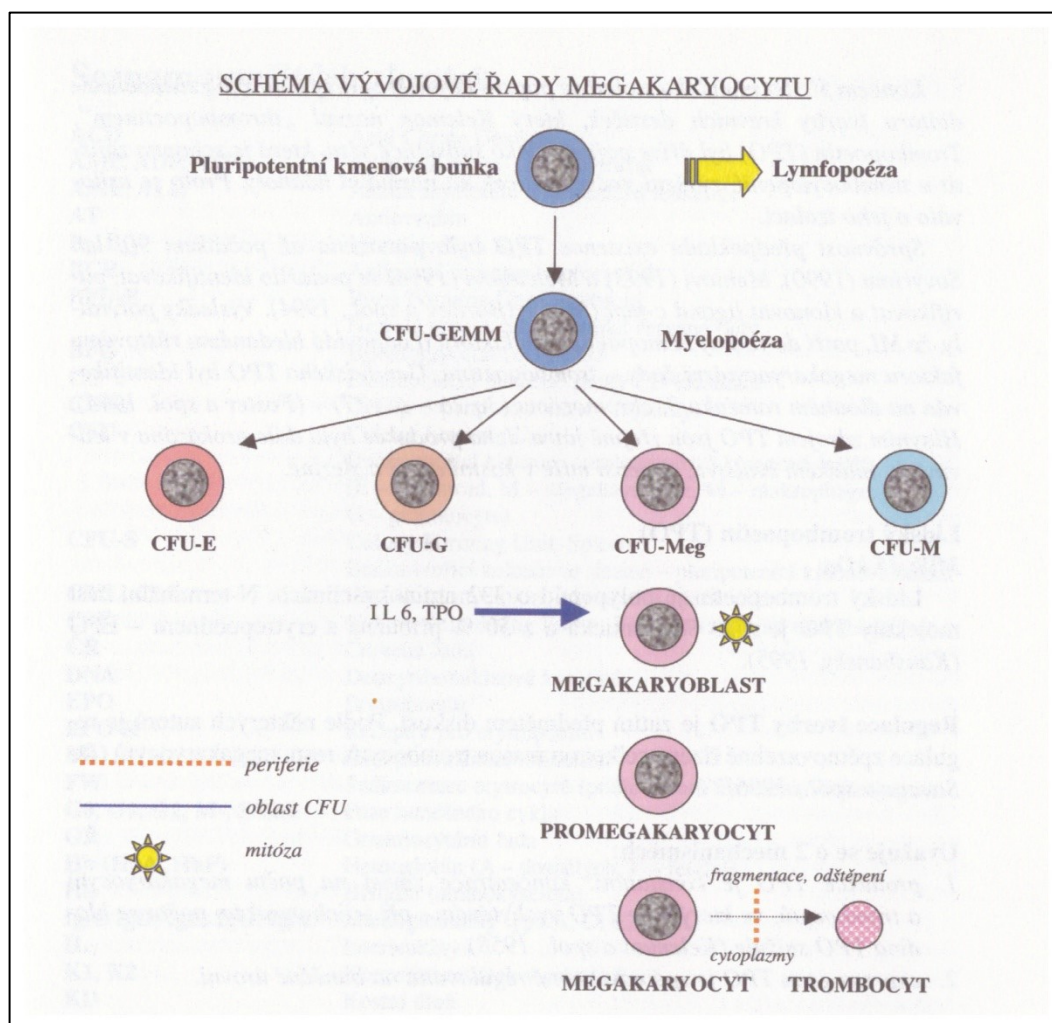
Megakaryocytární linie, která se přímo vyvíjí z BFU-Meg (BFU-MK) v CFU-Meg, se diferencuje na promegakaryoblasty, megakaryoblasty, promegakaryocyty a na zralé a nezralé megakaryocyty [17].

Trombocyty se tedy tvoří odštěpením z megakaryocytů [22].

Čím jsou megakaryocyty více členité (lobulizované), tím bývá produkce destiček vyšší a vznikající trombocyty bývají i větší, na rozdíl od kulatých, nečlenitých buněk [22].

Proces tvorby destiček trvá za fyziologického stavu přibližně 5 hodin [22].

Na obrázku 7 můžeme vidět schéma vývojové řady megakaryocytu s konečnou tvorbou trombocytů.



Obrázek 7 Schéma vývojové řady megakaryocytu s produkcí trombocytu [1 ]

## 2.4.2 Morfologie trombocytů

Při pozorování krevních destiček pod elektronovým mikroskopem zjistíme, že stejně jako červené krvinky nemají jádro a tak spadají pod tzv. buňky neúplné [2].

Pomocí elektronového mikroskopu můžeme pozorovat určité mikrostruktury v trombocytech. Mezi trombotické struktury můžeme zařadit granule, mitochondrie, mikrotubuly, denzní (hutná) tělíška, otevřený kanálový systém, denzní tubulární systém a další [22].

- Plazmatický obal – je složen z albuminu, fibrinogenu,  $\text{Ca}^{2+}$  a ostatních plazmatických koagulačních činitelů. Hraje důležitou roli u trombotických reakcí [22].
- Membrána – je složena z bílkovin (57 %), lipidů (35 %) a sacharidů (8%). V membráně jsou přítomny transmembránové proteinové složky, které jsou důležité pro přenosy signálů. Velikost buněčné membrány se pohybuje okolo 6 – 10 nm [22].
- Glykokalyx – je složen převážně z glykoproteinů a v menší míře z glykolipidů. Glykokalyx je nejvrchnější vrstva u destičkových membrán a díky svému složení plní hlavně funkci receptorů [22].
- Otevřený kanálový systém - zasahuje do nitra buňky a v podstatě jde o vychlípení membrány trombocytu, kde tyto vychlípeniny zvětšují povrch buňky a zrychlují tím membránový transport. Díky tomuto systému se může dostávat obsah granulí na povrch trombocytů [22].
- Mitochondrie – jsou zdrojem energie pro trombocyty a tvoří přibližně 3 % celkového objemu krevních destiček [22].
- Granula – jsou přítomny v cytoplazmě a jsou ohraničeny membránou. Pokud trombocyty nejsou aktivovány tak granula bývají rozptýlena volně, při aktivaci trombocytů se začínají granula shlukovat [22].

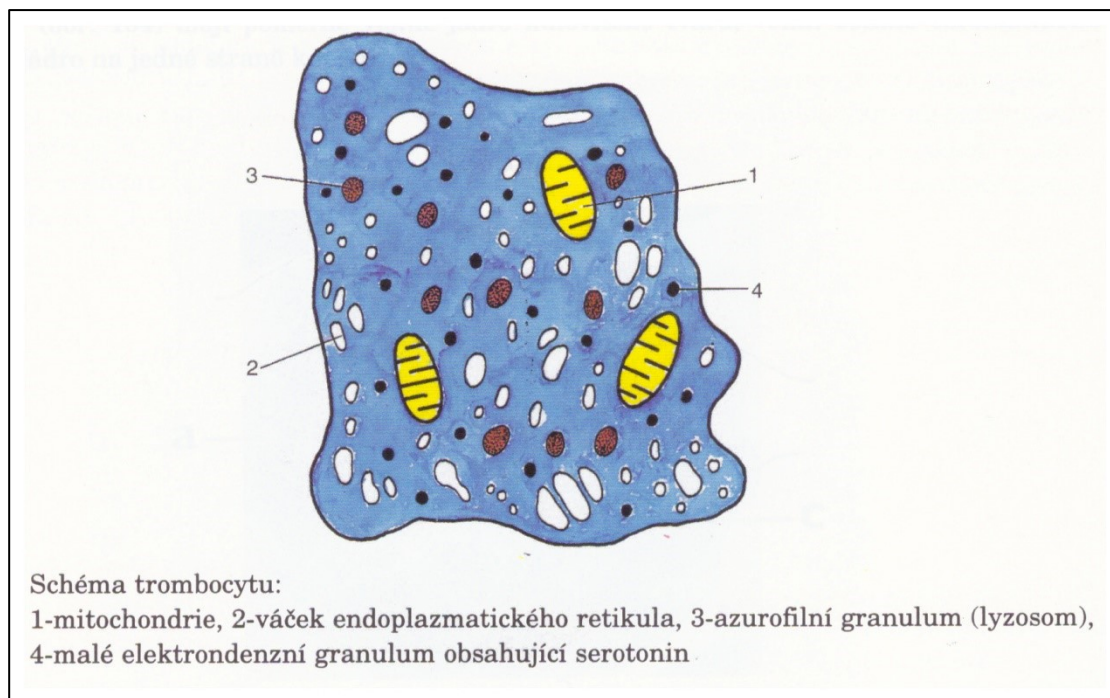
- Denzní tubulární systém – odpovídá hladkému endoplazmatickému retikulu, avšak neobsahuje ribosomy. Probíhá zde syntéza TXA<sub>2</sub> a některých bílkovin [22].
- Kontraktilní systém krevní destičky – je složený z početných vláknitých struktur. Řadíme zde cytoskelet, který udržuje diskoidní tvar destiček a jednotlivé organely na určitých místech [22].

V trombocytech můžeme rozlišovat 4 různé zóny:

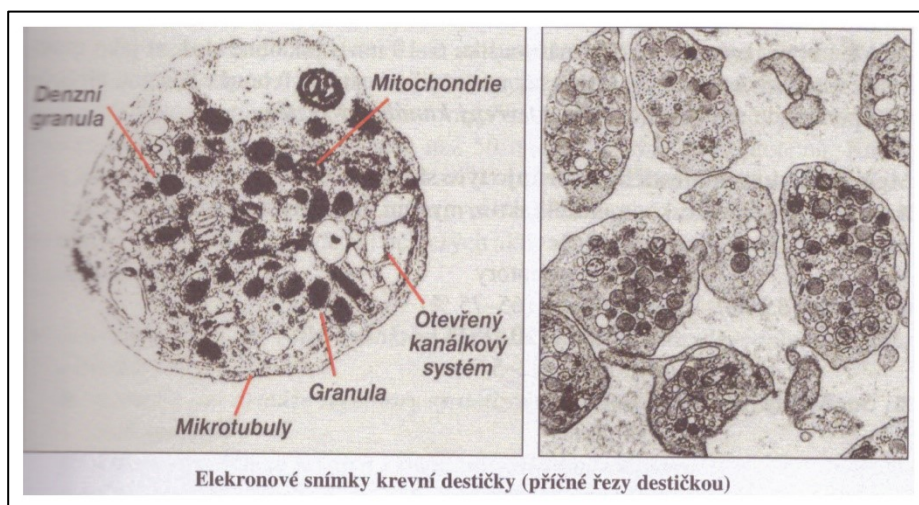
- Periferní zóna (Plazmatický obal) - do této oblasti spadá glykokalyx, membránové struktury a struktury submembránové [22].
- Zóna solubilního gelu (viskózní matrix – fibrinové proteiny) - obvodový pás mikrotubulů, membránové filamenty, mikrofilamenty a proteinové podjednotky. Všechny tyto struktury tvoří destičkový kontaktní systém [22].
- Oblast organel – denzní tělíska, mitochondrie, peroxizómy, lysozómy a alfa granula [22].
- Membránové systémy – otevřený kanálový systém a denzní tubulární systém [22].

Na obrázku 8 můžeme vidět obecné schéma trombocytu. Na obrázku 9 oproti tomu vidíme snímky příčných řezů destičkou pořízené elektronovým mikroskopem.





Obrázek 8 Obecné schéma trombocytu [16]



Obrázek 9 Elektronový snímek příčného řezu krevní destičky [16]



### **2.4.3 Funkce trombocytů**

Trombocyty zastávají v lidském organismu více významných úloh, mezi tyto úlohy můžeme počítat vliv na správnou funkci endotelových buněk, účast při hemostáze (vytvoření primární hemostatické zátky, aktivace plazmatických koagulačních faktorů) a vykazování fagocytární aktivity [2]. Některé funkce těchto buněk mohou mít i záporný charakter, můžeme zde zařadit právě trombózu, která vyvolává ischemii postižené oblasti a v žilách dochází k zhoršenému odtoku krve. Také je prokázáno, že krevní destičky se podílejí na vzniku aterosklerózy a pravděpodobně mohou mít i vliv na etiopatogenezi diabetu mellitu [22].

## **2.5 Vybrané sledované krevní parametry**

### **2.5.1 IPF**

IPF je v dnešní době považován za rozšířený parametr krevního obrazu, který vyjadřuje podíl nezralých, mladých, retikulovaných trombocytů v periferní krvi [21].

Jeho normální hodnota je udávána pro měření na analyzátorech Sysmex kolem 1-6 % z celkového počtu trombocytů. Jiná technologie, např. analyzátory Abbott udává IPF rozmezí nižší [21].

Hladina tohoto parametru se zvyšuje společně s rostoucí tvorbou krevních destiček v kostní dřeni. Její měření je vyhodnocením produkce trombocytů v kostní dřeni, které se provádí ze vzorku periferní krve pacienta. Podobně tak, jako může počet retikulocytů indikovat tvorbu červených krvinek [21].

Parametr % IPF má značný klinický přínos při léčbě trombocytopenií a při další laboratorní diagnostice. Může být nápomocný u podpory diagnózy trombocytopenické purpury a může sloužit též jako pomocný neinvazivní indikátor útlumu a selhávání funkce kostní dřeně, kde bývá hodnota % IPF nízká [21].

Tento parametr může být také používán jako citlivé měřítko pro posuzování zotavování pacienta při trombocytopeniích a při aplastických anémiích např. po prodělaných chemoterapiích [21].

Další využití tohoto parametru je možné vidět při podávání transfuzních trombocytů (náplavů), kdy na podání transfuze trombocytů můžeme pomýšlet primárně v případech, kdy hodnoty % IPF nestoupají a zůstávají nízké [21].

Pokud totiž velikost parametru IPF stoupá, naznačuje to fakt, že je zachována trombopoetická aktivita v kostní dřeni [21].

Parametr IPF může napomáhat v diferenciální diagnostice u různých příčin trombocytopenie, a proto nemusí být vždy ihned prováděna biopsie kostní dřeně, což vede k menší zátěži samotných pacientů [21].

### **2.5.2 CRP**

CRP neboli C-reaktivní protein, je rozšířený a sledovaný biochemický marker, který má značný klinický význam při diagnostice zánětlivých reaktivních stavů, často doprovázených bakteriálními záněty [7].

U zdravého člověka bývá v krvi koncentrace tohoto parametru velmi nízká. Jeho koncentrace v séru začíná růst kolem 6. - 9. hodiny od začátku zánětu a svého

vrcholu dosahuje za 1-3 dny. Pokud bychom srovnávali CRP s jinými bílkovinami, akutního zánětu, samotný CRP reaguje nejrychleji a s největším nárůstem. Nejvyšší koncentrace CRP vyvolávají záněty bakteriální, naopak záněty virové vyvolávají nárůst mírný. Na tomto faktu je založeno rozlišování typů zánětů na: virové a bakteriální, což se hojně využívá pro indikaci předepsání antibiotické léčby např. již v ordinacích praktického lékaře [6].

Pro průkaz CRP existuje celá řada starších semikvantitativních testů, kde mez detekce při aglutinačních testech je kolem 10 mg/l. Novější imunochemický princip funguje na principu, kdy latexové částice jsou potaženy specifickou protilátkou, která v přítomnosti tohoto proteinu aglutinuje (precipituje) a vytváří tak zákal až sraženinu [7].

## 2.6 Trombocytopenie

Trombocytopenie je onemocnění, které se projevuje při nepoměru mezi tvorbou trombocytů, nebo jejich zánikem [23]. Jedná se o patologický stav, který je charakterizován sníženým počtem trombocytů pod dolní referenční mez  $150 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$  [24].

Příčina tohoto onemocnění může být dvojího typu, buď v kostní dřeni (snížená tvorba krevních destiček), nebo v krvi periferní (zvýšený zánik trombocytů), případně je možná kombinace obou mechanismů [23].

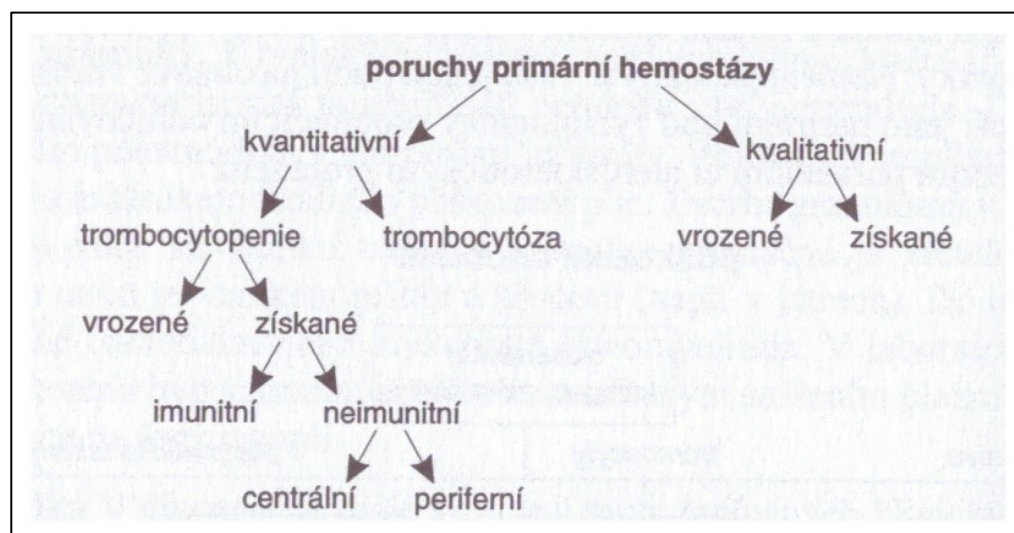
Trombocytopenie může být v některých případech doprovázena spontánním krvácením. Spontánní krvácení je obvyklé při počtu destiček pod  $20 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$ . [24] U některých pacientů se krvácení vyskytuje již při počtu  $80 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$  [25].

Pomocným parametrem při hledání příčiny vzniku trombocytopenie – tj., zda se jedná o nadměrný zánik krevních destiček v periferní krvi, nebo dřeňový útlum, je i námi sledovaný parametr IPF. U opakovaně vysokých hodnot tohoto parametru se jedná o zvýšený zánik trombocytů a naopak u normálních nebo snížených hodnot se jedná nejspíše o dřeňový útlum [23]. IPF parametr může přinést obrovskou výhodu v diagnostice trombocytopenií díky tomu, že není nutné pospíchat vždy s invazivními diagnostickými výkony jako je sternální punkce nebo trepanobiopsie kostní dřeně [25].

### 2.6.1 Druhy trombocytopenií

Trombocytopenie můžeme rozdělit na vrozené nebo získané, získané pak dále na imunitní a neimunitní, kdy neimunitní mají dvě podjednotky: centrální a periferní [24].

Schéma poruchy primární hemostázy můžeme vidět na obrázku 10.



Obrázek 10 Poruchy primární hemostázy [24]

### 2.6.1.1 Imunitně podmíněné trombocytopenie

Nevýznamnějším onemocněním spojeným s tímto druhem trombocytopenie je:

- **Idiopatická trombocytopenická purpura (ITP):**

U tohoto onemocnění dochází k slizničním nebo povrchovým kožním krvácením, která se projevují izolovanými petechiemi nebo splývavými krváceními. Toto onemocnění nabývá formy akutní nebo chronické [24].

**Akutní** – projevuje se většinou po předchozí infekci, která je zpravidla virového původu. Doba tohoto onemocnění se pohybuje pod půl roku, postihuje nejčastěji malé děti ve věku od 2-7 let a projevuje se sníženým počtem trombocytů pod hodnotu  $20 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$  [24].

Příčina vzniku této formy je pravděpodobně dána přítomností a následným účinkem imunokomplexů, které utvoří Ag (vir) a Ab (protilátky) [24].

**Chronická** – tato forma se týká především dospělých jedinců, častěji je tato forma prokazována u ženského pohlaví. Příčina je v chronickém patologickém procesu, který právě probíhá. Při procesu jsou tvořeny autoprotilátky proti trombocytům [24].

- **Idiopatická trombocytopenická purpura v těhotenství:**

Toho onemocnění se vyskytuje u více než 7 % budoucích matek. Trombocytopenická purpura v těhotenství se vyskytuje jako imunitní nebo také jako neimunitní [24].

- **Izoimunitní novorozenecká trombocytopenie**

K tomuto onemocnění dochází u 0,5 % novorozenců. Poporodní hodnoty trombocytů se pohybují okolo  $10 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$ . U 15 % těchto jedinců bývá přítomno mozkové krvácení [24].

- **Posttransfuzní purpura**

K nástupu dochází přibližně za týden po podání krevní transfuze. Počet trombocytů se pohybuje pod hodnotou  $10 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$  [24].

- **Polékové trombocytopenie**

K polékové trombocytopenii dochází po podání medikace. U pravidelného podávání léků vznikne za 7-10 dní od začátku užívání. U jednorázových podáních vzniknou za pár hodin nebo dní [24].

- **Heparinem indukované trombocytopenie (HIT)**

Někdy bývá spojována s trombózou. V případě výskytu se jedná o druh polékové trombocytopenie, který je spojen s užíváním heparinu (lék proti srážení krve). Vyskytuje se u 1-30 % pacientů využívající toto léčivo. Zde dochází ke krvácení a zvýšení trombózy [24].

- **HIV asociovaná trombocytopenie**

Jedná se o imunopatologické onemocnění, při kterém dochází k vytváření Ab proti krevním destičkám [24].

- **Antifosfolipidový syndrom – APS**

Při tomto syndromu se vyskytují protilátky, které jsou vytvářeny proti antigenům fosfolipidovým strukturám. Zde dochází k vytváření trombózy nebo ke krvácení (také obojí) [24].

#### **2.6.1.2 Neimunitně podmíněné trombocytopenie**

Do této skupiny můžeme zařadit:

- **Pseudotrombocytopenie**

Pseudotrombocytopenie je nazývána jako falešná trombocytopenie, která je diagnostikována sníženým počtem krevních destiček in vitro (ve zkumavce), ale in vivo zůstává hodnota fyziologická a normální. Tento stav je často způsoben imunoglobuliny, které způsobují zvýšené shlukování krevních destiček [23,24].

- **Trombocytopenie ze zvýšeného obratu a zániku destiček na periférii**

Do této skupiny můžeme začlenit trombotickou trombocytopenickou purpuru (TTP), hemolyticko-uremický syndrom (HUS) a diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC). TTP je pozorována v každém věku a převažuje u ženského pohlaví v poměru 2:3 oproti pohlaví mužskému. U syndromu HUS bývají postižené ledviny, které selhávají v důsledku poškození glomerulárních kapilár. V rámci HUS dochází často kromě selhání ledvin, také k trombocytopenii a hemolytické anémii. Syndrom DIC doprovází často jinou chorobu a vzniká díky narušování rovnováhy mezi složkami, které jsou součástí hemostatických mechanismů. Diseminovaná intravaskulární koagulopatie bývá vzácně primárního původu, ale velmi

často provází těžké až terminální stavy spojené s masivním krvácením. Po vyčerpání koagulačních faktorů dojde k nekontrolovatelnému život ohrožujícímu krvácení [24].

#### **2.6.1.3 Vrozené trombocytopenie**

Vrozené trombocytopenie nejsou běžné a patří mezi velmi vzácné poruchy. Jejich výskyt na světě je odhadován na desítky až několik tisíc případů [23].



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce je zhodnotit morfologicky velikost destiček v mikroskopickém nátěru a stanovit orientační kritéria pro další diagnostickou rozvahu na základě rozšířeného parametru IPF v souvislosti s ostatními dostupnými laboratorními nálezy a vývojem klinického stavu pacienta u trombocytopenických vzorků periferní krve s naměřenou zvýšenou hodnotou parametru IPF.

## 4 METODIKA

### 4.1 Definice souboru

#### 4.1.1 Vzorky k měření

Všechny vzorky, které byly použity pro mou bakalářskou práci, byly odebrány v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici Praha (ÚVN) na Oddělení hematologie a krevní transfuze (OHKT).

Vzorky k měření byly získány od vyšetřovaných pacientů s naměřenými krevními obrazy, jejichž hodnoty IPF byly vyšší než 10 % a počet jejich trombocytů byl nižší než  $100 \cdot 10^9$  /l krve.

Venózní krev byla vyšetřována různými způsoby, a proto byla odebrána do dvou typů odběrových vakuet.

Pro měření CRP byla krev nabrána do zkumavky (červené víčko Vacuette) pro srážlivou krev, v níž se v laboratoři centrifugací oddělilo sérum od krevních elementů a sérum bylo následně vyšetřováno na analyzátoru Roche Cobas c702.

Krev, ve které bylo potřeba stanovit KO, diferenciál a IPF byla odebrána zkumavky (fialové víčko Vacuette) s protisrážlivým roztokem  $K_3EDTA$ .

## 4.2 Přístroje

### 4.2.1 Nátěrový a barvicí automat Sysmex SP-1000i

SP-1000i je plně automatizovaný nátěrový automat používaný ve větších hematologických laboratořích, který provádí všechny potřebné úkony pro vytvoření preparátu obarveného krevního nátěru, ze kterého se odečítá mikroskopický diferenciální počet ve vzorku krve vyšetřovaného pacienta. Přístroj je určen pro uzavřenou manipulaci s periferní krví. Automatizované úkony, které vedou k vytvoření krevního nátěru, jsou: příprava nátěru (označení skla pro roztěr krve) a jeho panoptické obarvení [30].

Analyzátor SP-1000 můžeme vidět na obrázku 11.



Obrázek 11 Přední pohled na SP-1000i [Vlastní zdroj ]

#### 4.2.2 Hematologický analyzátor Sysmex XE-5000

Sysmex XE-5000 je plně automatizovaný hematologický analyzátor krevního obrazu využívaný v klinických hematologických laboratořích k diagnostickému použití pro proměřování celého spektra nejrozličnějších parametrů krve, dále také k cytometrické analýze počtu buněk mozkomíšního moku a ostatních tělních tekutin vyjma moče [31].

Mezi hodnocené základní parametry krevního obrazu patří Hb, RBC, HtK, MCV, MCH, MCHC, RDW, WBC, PLT, MPV, PDW [35].

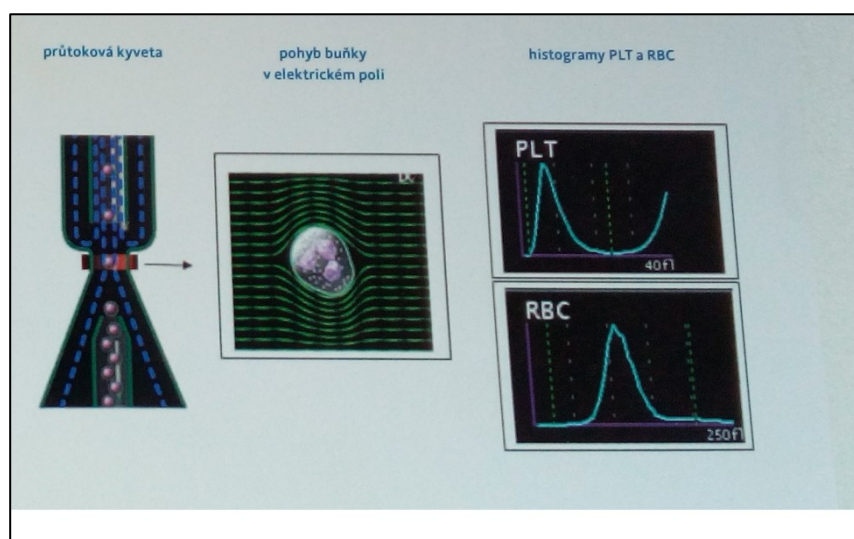
Přístroj využívá různé technologie, které umožňují kvalitní kvantifikaci krvinek. Nejčastější technologií pro měření počtu buněk v periferní krvi je impedanční měření nebo průtoková cytometrie s optickou detekcí [35].

Analyzátor v uzavřeném systému automaticky míchá a nasává vzorky krve z uzavřených zkumavek ve stojánku. Vzorky krve obsahují EDTA jako antikoagulační činidlo (použito K<sub>3</sub>EDTA). K vyhodnocování měření jednotlivých vzorků dochází prostřednictvím kódu, který je nalepen přímo na zkumavce. Po nasátí, se krev automaticky rozděluje na alikvoty (malé části vzorku) před stanovením v různých měřících kanálech. K alikvotům se přidávají různé reagenty. Z těchto směsí krve a reagentů se odděluje přesný objem, který putuje do různých měřících komůrek pro identifikaci jednotlivých buněk. Takto lze měřit i předem ručně promíchané zkumavky v tzv. otevřeném systému [35].

Přístroj využívá následující metody:

- **Impedanční měření a hydrodynamická fokusace**

Slouží k měření počtu buněk na základě změny odporu při průchodu buňky polem stejnosměrného proudu. Velikost naměřeného signálu je úměrná objemu procházející buňky. Touto metodou dochází k měření počtů PLT, RBC a HCT [32]. Schéma impedančního měření s hydrodynamickou fokusací vidíme na obrázku 12.



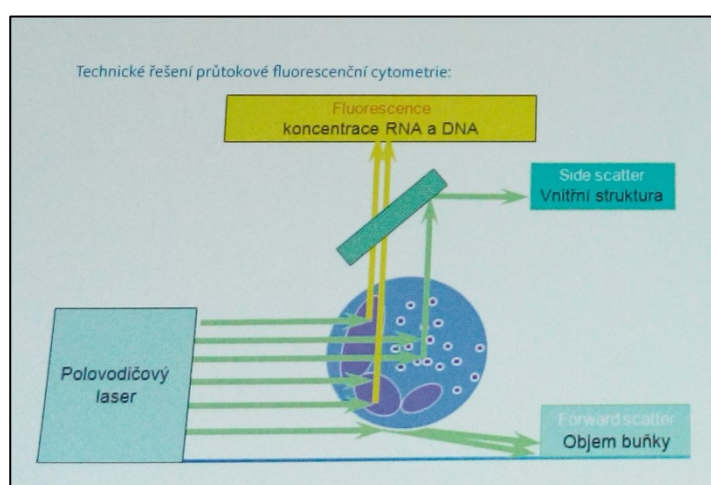
Obrázek 12 Schéma impedančního měření s hydrodynamickou fokusací [32]

- **Fluorescenční průtoková cytometrie**

Využívá se pro analýzu fyzikálních a chemických vlastností krvinek, pomocí této metody se stanovuje diferenciální rozpočet leukocytů, dále se používá pro měření počtu retikulocytů a normoblastů (NRBC). Metoda nás informuje o velikosti buňky (FSC detektor – přímý rozptyl), o vnitřním uspořádání buňky (SSC detektor – boční rozptyl) a o obsahu RNA/DNA v buňce (SFL detektor – boční fluorescenční světlo). Při měření se vzorek krve nejprve nasaje do analyzátoru a rozdělí se na části,

poté se vzorek naředí a dochází k značení fluorescenčním barvivem (fluorochromem), který se specificky váže na NK. Následně se vzorek přesouvá do průtokové velmi úzké komůrky, kde dochází k průchodu laserového paprsku. Detektory poté vyhodnotí rozptyl tohoto paprsku. [35]. Frakce nezralých trombocytů IPF vyplavených do periferní je charakterizovaná zbytkovým množstvím ribonukleové kyseliny.

Schéma fluorescenční průtokové cytometrie vidíme na obrázku 13.



Obrázek 13 Schéma fluorescenční průtokové cytometrie [32 ]

Analyzátor krevního obrazu bývá propojen s přístrojem SP-1000i. Tento nátěrový a barvicí automat připravuje dále sklíčka pro mikroskopický odečet [30].

Sysmex XE-5000 můžeme vidět na obrázku 14.



Obrázek 14 Přední pohled na Sysmex XE-5000 [Vlastní zdroj]

#### 4.2.3 Zařízení na digitální morfologii Cella Vision DM 1200

Cella Vision DM 1200 je systém založený na tzv. digitální morfologii, které slouží k diagnostickému použití in vitro a pomáhá školenému personálu provádět diferenciaci buněk a jejich odečet pro předchozí automatické preklasifikaci každé buňky. Tento přístroj funguje na principu automatického vyhledávání a prezentace snímků (scanů) buněk v krevních nátěrech vzorků pacientů, které porovnává s databází buněk uloženou v paměti systému [32].

Analyzátor slouží k automatickému mikroskopickému zhodnocení nátěru periferní krve (PB) – provádí diferenciální rozpočet leukocytů, popisuje morfologii erytrocytů, příp. i trombocytů [32].

Přístroj je složen z několika částí. První část tvoří jednotka snímání sklíček, která je složena z mikroskopu a kamery. Druhou část tvoří počítačový sofistikovaný systém, který klasifikuje, počítá a taktéž vyhodnocuje vytvořené snímky nátěrů [32].

Do třídy WBC (bílé krvinky), které jsou v rámci diferenciálu vyhodnocovány, patří – neutrofily (tyčky + segmenty), bazofily, eozinofily, monocyty, lymfocyty, plazmatické buňky, blasty, promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty a další případné buňky [32].

Pomocí DM 1200 zachytit i velké trombocyty, trombotické shluky (agregáty), normoblasty, rozpadlé buňky apod [32].

Příprava vzorku pro diferenciální rozpočet spočívá v roztěru krve vzorku pacienta na speciální sklíčko. Následuje panoptické barvení, ruční nebo přístrojové (SP-1000i). Po vložení hotového označeného sklíčka v tzv. plastovém držáku - magazínu do DM 1200 dochází k načtení vzorku pomocí čárového kódu a automatického vyhodnocení preparátů systémem [32].



Cella Vision DM 1200 můžeme vidět na obrázku 15.



Obrázek 15 Přední pohled na Cella Vision DM 1200 [Vlastní zdroj ]

#### 4.2.4 Optický mikroskop

Optický mikroskop je zařízení, které umožňuje rozpoznávat struktury, které nejsme schopni vidět pouhým okem. Rozlišovací schopnost lidského oka je 0,2 mm. Pokud chceme zvětšit tuto rozlišovací schopnost, můžeme využít světelný mikroskop, který má zvětšení 40 – 1000 x, jehož rozlišovací schopnost je např. 0,2  $\mu\text{m}$ . Tímto nám umožní pozorování krevních buněk a jejich diferenciaci. Světelný mikroskop má tři základní části, kterými jsou: část optická (objektiv, okulár), část osvětlovací (světelný zdroj, kondenzor, clona, filtry, zrcátko) a část mechanická

(podstavec, stativ-nosič, tubus, měnič objektivů, stolek se svorkami, šroub s mikrometrem a makroposuvem) [29].

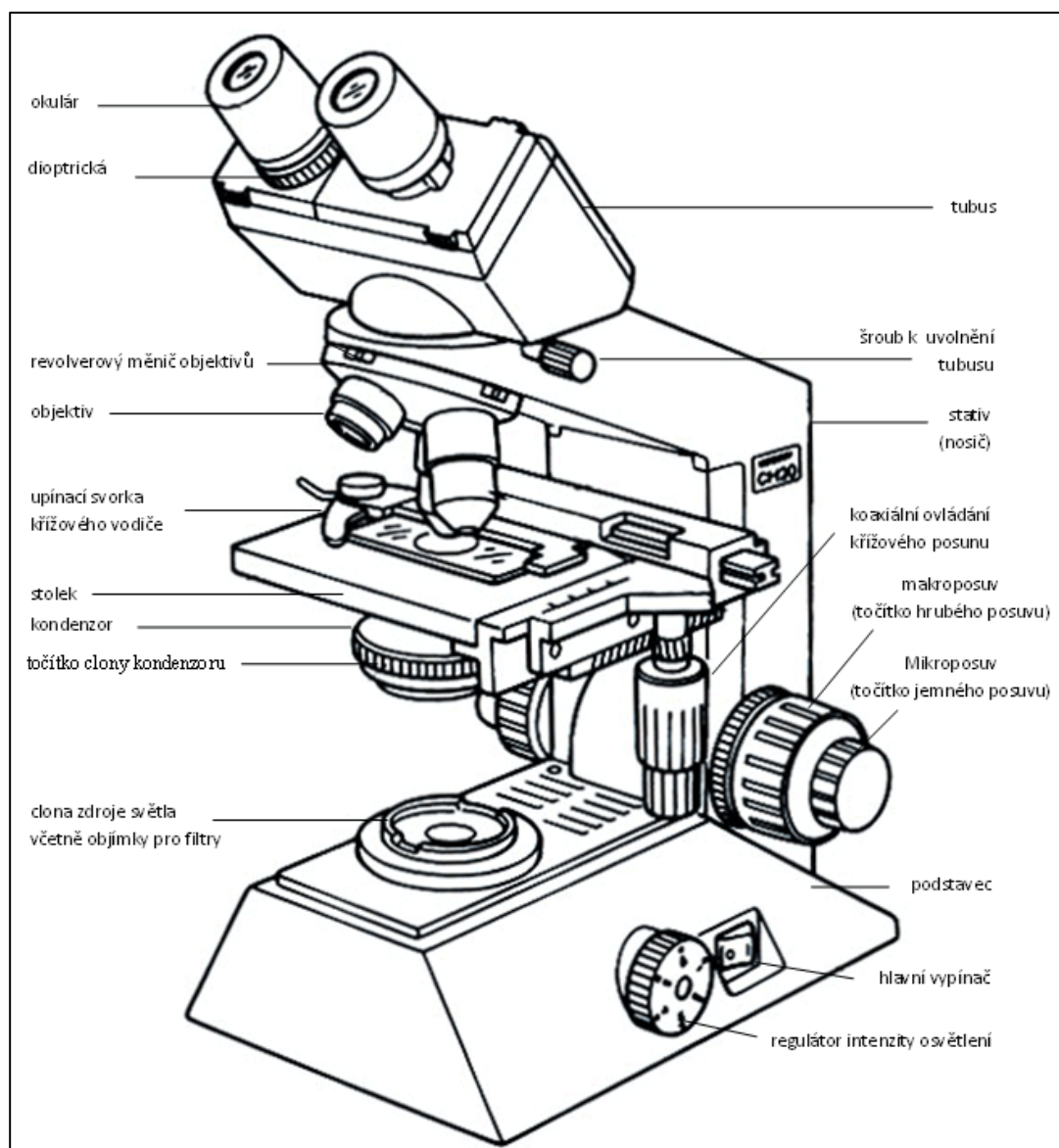
U optických mikroskopů rozeznáváme dva typy objektivů podle použitého média mezi objektivem a čelní čočkou objektivu. Prvním typem jsou objektivy suché (zvětšují 2 – 60x), kde mezi objektem a čelní čočkou objektivu se nachází vzduch ( $n=1$ ). Druhým typem jsou objektivy imerzní (zvětšující 90 – 100x), kde mezi objektivem a objektem se nachází médium (tzv. imerzní olej), který má přibližně stejný index lomu jako podložní sklíčko, čímž se zvyšuje rozlišovací schopnost pozorování [29].

Na obrázku 16 můžeme vidět přední pohled na laboratorní mikroskop CX41.



Obrázek 16 Přední pohled na laboratorní mikroskop CX41 [Vlastní zdroj]

Na obrázku 17 můžeme vidět popis součástí světelného mikroskopu.



Obrázek 17 Popis součástí světelného mikroskopu [29]

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Odběr krve pro měření IPF, CRP

#### 4.3.1.1 Odběr krve pro měření IPF

Měření parametru IPF se provádí v rámci měření krevního obrazu z periferní krve. Jedná se tedy o odběr venózní krve do standardních zkumavek, které obsahují protisrážlivé koagulační činidlo, kterým je v našem případě  $K_3EDTA$  (trojdraselná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové). Samotný odběr se provádí jehlou v uzavřeném systému, nejčastěji z véna cubitalis [28].

Uzavřený systém značí, že krev je odebírána pomocí vakuového systému. Ze zkumavky, kam je čerpána krev, je odebrán vzduch a po styku zkumavky s jehlou zavedenou do vény, díky vlivu vakua, dochází k nasátí krve [28].

$K_3EDTA$  je látka, která má vysokou afinitu k iontům kovů, tyto kovy poté vyvazuje z plazmy. Tento antikoagulant tedy vyvazuje kalciové kationty ( $Ca^{2+}$ ) a tím udržuje krev nebo plazmu nesrážlivou. Při odběru je vyžadováno jemné promísení krve s antikoagulační látkou, proto se vakueta v dlani odběrové sestry jemně převrací 5 – 10 krát dnem vzhůru [28].

Nátěr z periferní nesrážlivé krve má být zhotoven do 2 – 5 hodin po jejím odběru, neboť po překročení této doporučené doby dochází k narušování krevních elementů – rozpadu buněk, nejprve granulocytů [28].

#### 4.3.1.2 Odběr krve pro měření CRP

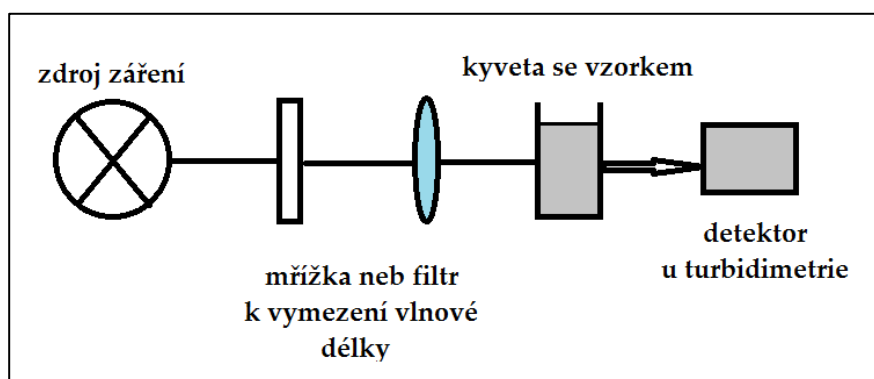
Pro měření CRP jsme použili venózní srážlivou nebo nesrážlivou (EDTA) krev.

#### 4.3.2 Stanovení CRP pomocí analyzátoru Roche Cobas c702.

CRP se dá stanovit z lidského séra nebo plazmy, k měření byla použita imunoturbidimetrická metoda na analyzátorové lince Roche Cobas © 8000, konkrétně na analyzátoru na fotometrickém modulu Roche c702. Principem imunoturbidimetrie je to, že lidské CRP aglutinuje s latexovými částicemi, které jsou potaženy monoklonálními protilátkami právě proti tomuto proteinu. Vzniklý agregát se měří turbidimetricky [34].

Turbidimetrie využívá rozptylu světla na částicích obsažených v měřených suspenzích či koloidních roztocích. Při turbidimetrii dochází k měření záření, které bylo ochuzené o část záření, které se při průchodu rozptýlilo. Detektor se nachází v ose paprsku, což je bod, který odlišuje turbidimetrii od nefelometrie [36].

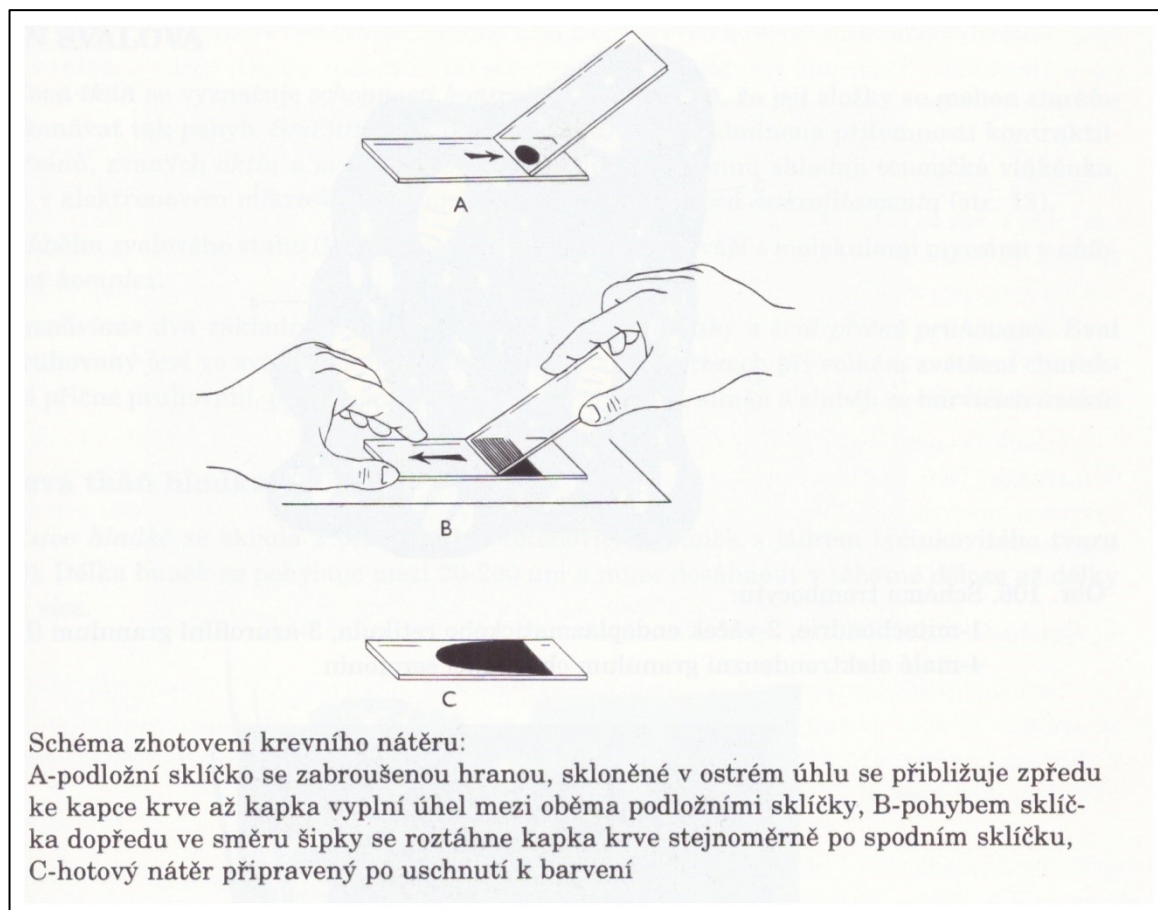
Schéma turbidimetru můžeme vidět na obrázku 18.



Obrázek 18 Schéma turbidimetru. [převzato a upraveno z 36]

#### 4.3.3 Ruční zhotovení krevního nátěru

Krevní nátěr je mikroskopický preparát, který se získává rozetřením kapky krve, v našem případě krve periferní, na podložním sklíčku a následně dochází k jeho obarvení. Schéma zhotovení krevního nátěru můžeme vidět na obrázku 19. Nátěry se zhotovují z čerstvě odebrané plné krve, nebo z krve, která obsahuje nejčastěji jako antikoagulační přísadu EDTA [27].



Obrázek 19 Schéma zhotovení krevního nátěru [16]

Postup zhotovení krevního nátěru:

- 1.) Připraví se čisté, suché a odmaštěné podložní sklíčko, které se před začátkem musí popsat tužkou nebo štítkem na zabroušené straně, aby nedošlo k záměně vzorku pacienta
- 2.) Na kraj podložního sklíčka se nanese 1 kapka krve (např. krve periferní) přibližně 0,5 - 1 cm od okraje.
- 3.) Připraví se podložní sklíčko se zabroušenou hranou, které se nakloní v ostrém úhlu ( $45^{\circ}$ - $30^{\circ}$ ), v tomto úhlu s ním pohybujeme ke kapce krve, do okamžiku, kdy kapka krve vyplní úhel mezi oběma sklíčky. Čím je úhel ostřejší, tím je nátěr tenčí.
- 4.) Následně se sklíčkem se zabroušenou hranou roztírá krev rychlým pohybem zpět. Krev se nikdy nesmí roztírat před sklíčkem, ale musí být tažena za sklíčkem, které slouží jako sklíčko roztěrové. Pokud tento fakt není dodržován, dochází k ničení buněk a následuje znehodnocení vzorku.
- 5.) Správně provedený nátěr by měl být 3 – 6 cm dlouhý a postupně by se měl ztenčovat.
- 6.) Krevní nátěr se nechává zaschnout a následuje barvení [27].

#### **4.3.4 Strojový nátěr periferní krve**

Strojový nátěr s barvením periferní krve se provádí pomocí nátěrového a barvicího automatu Sysmex SP-1000i, který je mnohdy začleněn do rutiny laboratoře. Tento přístroj zhotovuje krevní nátěry v závislosti na hodnotě hematokritu každého vzorku, ze kterého má být vyroben. Podle hodnoty hematokritu dochází k nastavení úrovně krevního nátěru (úhel a rychlost) [30]. Strojové barvení využívá všech kroků, zmíněných v části 4.3.5, které jsou prováděny přístrojem SP-1000i.

#### **4.3.5 Panoptické barvení manuální**

Panoptické barvení, či barvení podle Pappenheima je rutinní barvicí metoda, která se používá k barvení cytologických preparátů. Uplatnění této metody

nalézáme například v hematologických laboratořích, kde se takto barví nátěry periferní krve, punktáty kostní dřeně nebo záhustky(koncentráty) mozkomíšního moku (likvoru). Dá se říci, že panoptické barvení je kombinací dvou typů barvení a to: Mayova-Grünwaldova a Giemsy-Romanowského [26].

Postup u tohoto barvení je následující:

- 1.) Připravený suchý preparát se převrství, po dobu 4 minut, May-Grünwaldovým barvivem (metanolvý roztok eosinu a metylénové modři), kdy přítomný metanol preparát zafixuje.
- 2.) Následně se preparát krátce opláchne destilovanou vodou, roztok se slije a preparát se převrství roztokem Giemsa-Romanowski (přítomná barviva jsou Azur II-eosin a Azur II.), který vznikl smícháním 1 ml zásobního roztoku s 9 ml destilované vody po dobu 15 minut (10-20 minut). Roztok Giemsa-Romanowski může být připraven i způsobem, že na 10 ml destilované vody připadá 10 – 15 kapek barviva.
- 3.) Preparát se opláchne důkladně pod tekoucí vodou, spodní stranu sklíčka osušíme utěrkou a necháváme preparát vyschnout [26,27].

## **4.4 Postup měření**

### **4.4.1 Měření krevního obrazu na analyzátoru Sysmex XE-5000**

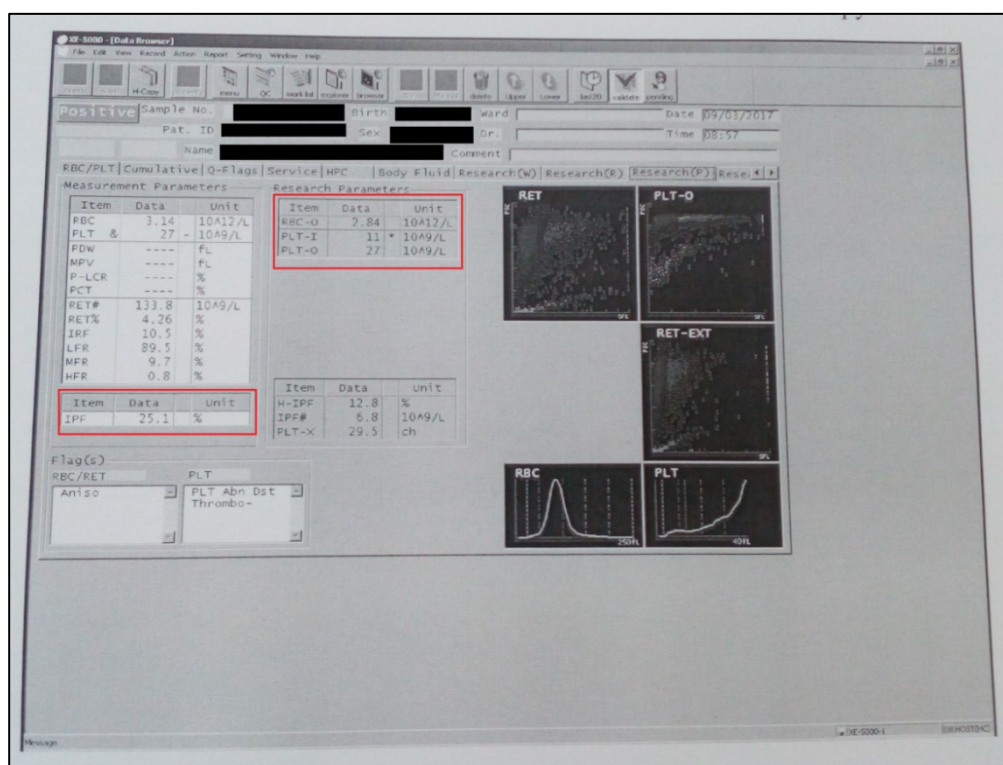
Při samotném měření krevního obrazu, jsem zkumavku s periferní krví pacienta a protisrážlivým činidlem K<sub>3</sub>EDTA v rukavicích, nejprve otočil dvakrát dnem vzhůru, aby byla provedena homogenizace. Následně jsem vzorek umístil do stojánku (racku) a vložil jej do Sysmexu XE-5000. Stiskl jsem tlačítko START a zkumavka s nalepeným čárovým kódem byla načtena do přístroje. Po načtení a promíchání vzorku analyzátor změřil cca za 1 minutu krevní obraz i s diferenciálem leukocytů a výsledky se objevily na display.



Rutinně se měří destičky s erytrocyty impedančně. U trombocytopenického vzorku (nízkého počtu trombocytů pod  $50 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$ .) a při vysoké anizocytóze PLT (PDW a MPV bylo nehodnoceno) je na místě doměřováno opticky, tedy pomocí FC.

Výběr vzorku byl pro vybírání byli vzorky s vyšším IPF a s nízkým PLT. Vzorek pro optické měření (měření FC) se zadává pomocí retikulocytového kanálu.

Na obrázku 20 můžeme vidět výsledný list z analyzátoru Sysmex XE-5000, změřeného vzorku pacienta, kterému byly z důvodu ochrany osobních údajů začerněny identifikační údaje. Výsledky, které byly nejdůležitější pro mé pozorování, jsou červeně označeny rámečkem.



Obrázek 20 Primární výtisk vzorku z analyzátoru Sysmex XE-5000[Vlastní zdroj]

#### 4.4.2 Měření CRP na analyzátoru Roche cobas c702.

Při měření CRP jsem vyšetření prováděl ze zkumavky, která obsahovala K<sub>3</sub>EDTA a byla po změření krevního obrazu stočena v centrifuze. Vyšetření tedy bylo prováděno z plazmy. Pokud bylo CRP již změřeno v séru (nesrážlivá krev), byl tento výsledek použit pro naše studijní účely. Zkumavku s nalepeným identifikačním štítkem jsem v rukavicích umístil do stojánku, který jsem poté vložil do analyzátoru Cobas a stiskl tlačítko START. Po načtení vzorku byl vzorek měřen a zhruba po 20 minutách byl výsledek přenesen do LIS.

#### 4.4.3 Zhotovení krevního nátěru pomocí SP-1000i

V momentě, kdy Sysmex XE-5000 vyhodnotil, že IPF je větší než 10 % a PLT bylo menší než  $100 \cdot 10^9/\text{l}$ , nechal jsem zhotovit krevní nátěr pomocí SP-1000i. Výsledný krevní nátěr můžeme vidět na obrázku 21 (začerněny identifikační údaje, z důvodu ochrany osobních údajů).

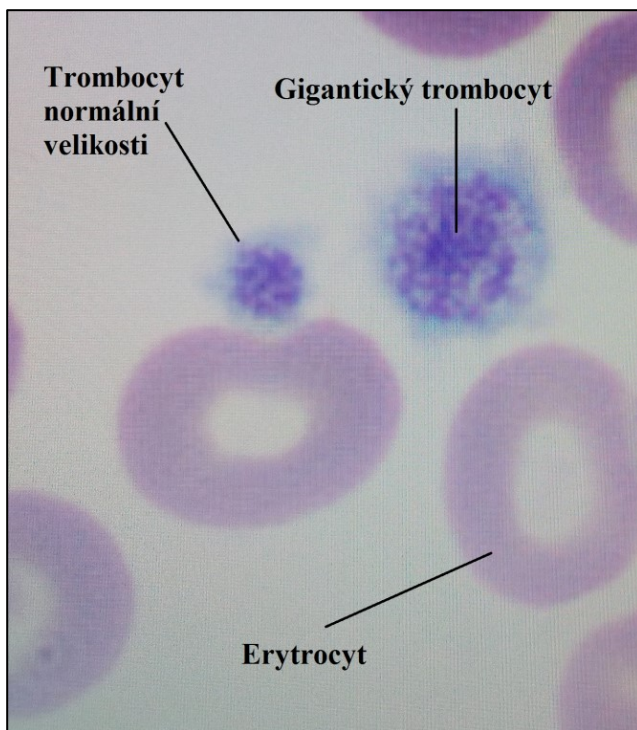


Obrázek 21 Zhotovený krevní nátěr [Vlastní zdroj]

#### 4.4.4 Morfologické hodnocení na zařízení pro digitální morfologii Cella Vision DM 1200

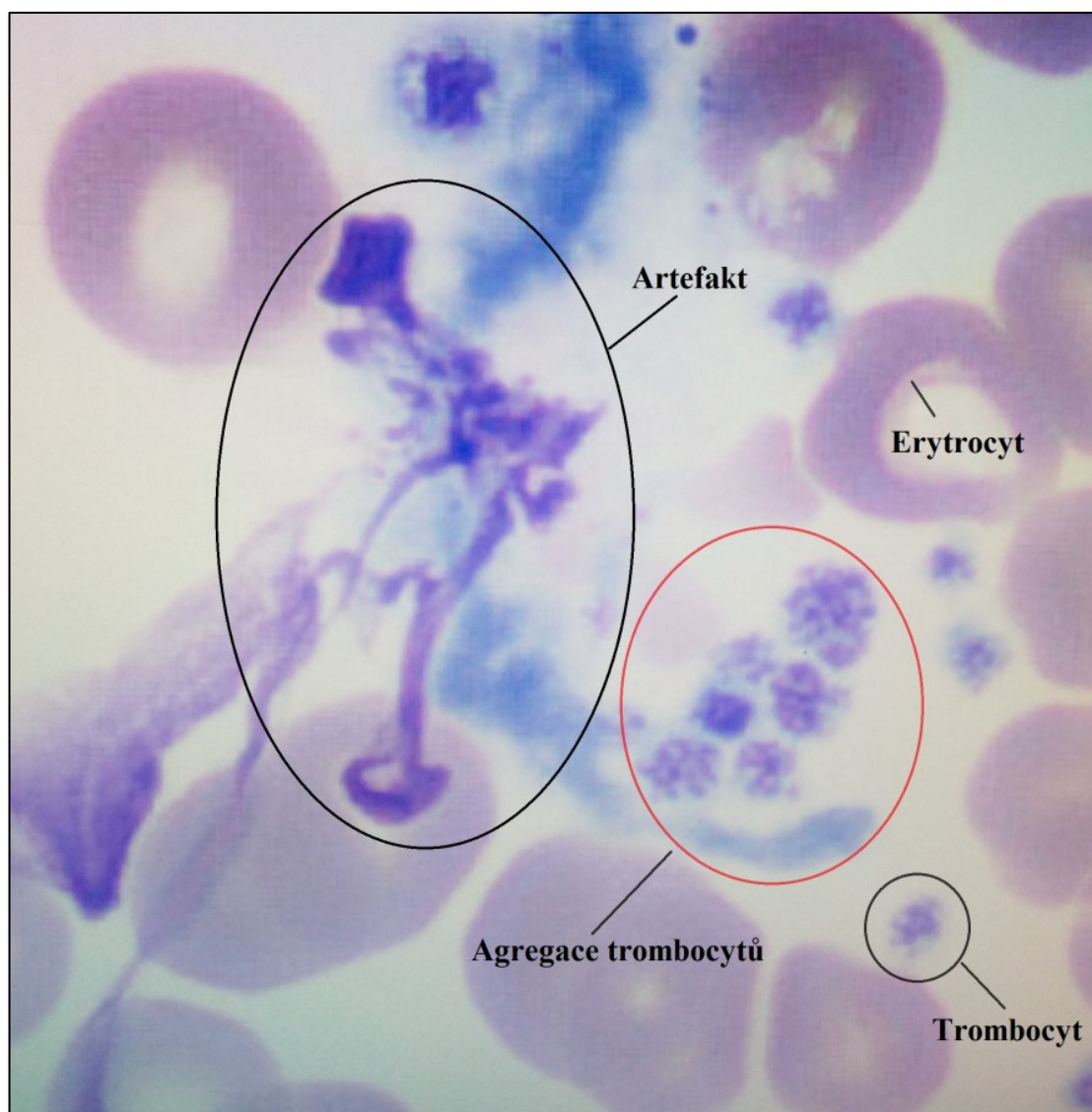
Skříčko s krevním nátěrem (obarveným), získaným pomocí přístroje SP-1000, jsem umístil do oranžového zásobníku (magazinu). Oranžový zásobník jsem vložil do analyzátoru Cella Vision DM 1200 a automaticky bylo spuštěno měření. Měření jednotlivých preparátů probíhá pomocí indentifikace sklíčka, které je označeno speciálním kódem. Po několika minutách analyzátor poskytl výsledky a jednotlivé snímky buněk. Zde jsem provedl diferenciální rozpočet leukocytů, morfologii trombocytů, velkých až gigantických trombocytů a naposled ověřil i to, zdali nejsou přítomné trombotické agregace. Pokud byly shluky přítomné v krevním nátěru, nátěr jsem ihned vyřadil ze souboru pozorování.

Na obrázku 22 můžeme vidět snímek pořízený přístrojem DM 1200.



Obrázek 22 Snímek morfologie trombocytů, pořízený přístrojem DM 1200 s popisem [Vlastní zdroj]

Na obrázku 23 můžeme vidět nežádoucí agregaci trombocytů.



Obrázek 23 Snímek zachycující trombotickou agregaci, pořízený přístrojem DM 1200 s popisem  
[Vlastní zdroj]

#### 4.4.5 Morfologické hodnocení na optickém mikroskopu

Všechna sklíčka, která byla pořízena od pacientů s naměřenou vysokou hodnotou IPF a nízkou hodnotou PLT jsem pozoroval v optickém mikroskopu CX41 s imerzí. Ručně jsem provedl DIF a zhodnotil stručně morfolologii trombocytů.

## 5 VÝSLEDKY

Výsledky našich měření vycházely se souboru, který obsahoval původně 37 vzorků pacientů, kdy vyhovujících bylo 32. Naměřená data 32 vzorků byla vložena do patřičných tabulek a data byla statisticky zpracována. Výpočty a grafy byly vytvořeny pomocí statistického softwaru Statistica 11 od společnosti StatSoft ČR s.r.o., který je určený k biostatickým výpočtům klinických studií. Mezi výsledky kvalitativní můžeme řadit mikroskopický odečet, zatímco mezi výsledky kvantitativní řadíme samotné měření a statistické zpracování dat.

### 5.1 Výsledky měření

Součástí této podkapitoly jsou jednotlivá data měření, která jsou vložena do jednotlivých specifických tabulek.

U pacientů byly naměřeny tyto parametry – PLT (počet krevních destiček), IPF (frakce nezralých trombocytů), CRP (C-reaktivní protein), MPV (průměrný objem destiček), PDW (distribuční křivka krevních destiček, která udává přehled o variabilitě ve velikosti krevní destičky), PCT (prokalcitonin), RTC (retikulocyty), NLR Ne/Ly (neutro/lymfo counts ratio), strojový poměr Ne/Ly. Z krevního nátěru byly odečteny tyto parametry- počet neutrofilních tyčů, přítomnost dalších nezralých forem a počet makrotrombocytů s jejich popisem.

V tabulce 1 jsou uvedeny referenční hodnoty pro měřené parametry. Udaná používaná referenční rozmezí jsou používána na OHKT ÚVN v souladu s doporučeními ČHS ČLS JEP.

*Tabulka 1 Referenční hodnoty měřených parametrů*

<b>Měřené parametry</b>	PLT ( $\cdot 10^9/l$ )	IPF (%)	CRP (mg/l)	MPV (fl)	PDW (fl)	PCT (ug/l)	RTC Abs ( $\cdot 10^9/l$ )	RTC Rel (%)	NLR (Ne/Ly)	Počet neutrofilních tyčí (%)
<b>Referenční rozpětí pro dospělé</b>	150-400	1- 6,1	0-5	7,8- 11	9-17	do 0,5	25-100	0,5- 2,5	1,5-4	0-4

V tabulce 2 můžeme vidět diagnózy jednotlivých vzorků.

*Tabulka 2 Diagnózy jednotlivých pacientů*

Číslo pacienta	Diagnóza
1	trombocytopenie
2	zhoubný nádor jater
3	sekundární zhoubný nádor jater
4	diabetes mellitus typu II
5	myelodysplastický syndrom
6	akutní selhání ledvin
7	hematologické chronické onemocnění
8	určená poranění postihující více částí
9	zhoubný nádor střeva
10	plicní embolie
11	aplastická anémie
12	trombocytopenie
13	selhání srdce
14	nespecifická vnitřní onemocnění
15	tříselná kýla
16	dengue
17	AML (akutní myeloidní leukémie)
18	CML (chronická myeloidní leukémie)
19	plicní embolie
20	jaterní cirhóza
21	plicní embolie
22	onemocnění štítné žlázy
23	pertrochanterická zlomenina
24	krvácení do CNS
25	subarachnoidální krvácení
26	onemocnění štítné žlázy
27	močové kameny, sepse
28	enterokolitida + MAHA (Mikroangiopatická hemolytická anémie)
29	hydrops žlučníku
35	chronické selhání
36	diabetes mellitus typu II
37	bolest břicha



V tabulce 3 můžeme vidět primární data pro statistické zpracování.

*Tabulka 3 Primární naměřené sledované parametry jednotlivých pacientů*

Číslo pacienta	PLT-I (-10 <sup>9</sup> /l)	PLT-O (-10 <sup>9</sup> /l)	IPF %	CRP (mg/l)	RTC abs	RTC rel
1	3	8	36,1	30,6	16,9	0,39
2	71	75	14,1	30,8	78,7	2,59
3	43	41	13,6	215,3	68,7	2,20
4	99	104	16,5	0,6	33,6	0,90
5	33	44	27,6	2,1	38,7	0,84
6	11	25	22,10	136,2	21,3	0,54
7	102	113	18,5	4,2	36,3	0,72
8	90	101	20,3	47,1	35,6	1,20
9	52	55	18,2	207,9	42,4	2,23
10	5	8	26,20	56,4	180,4	4,85
11	109	114	16,3	11,5	24,5	1,33
12	16	30	47,5	1,8	35,5	0,86
13	76	67	19	47	73,7	2,16
14	58	68	17,2	3,5	40,6	0,88
15	73	83	8,9	1,4	61,8	1,49
16	46	58	11,5	0,7	19,5	0,36
17	18	27	25,6	66,6	62,9	1,14
18	4	7	31,8	54,5	4,7	0,14
19	66	75	19,2	105	110,7	2,63
20	37	46	23,2	1,8	77,9	2,34
21	33	37	20,7	83,4	136,2	3,12
22	97	86	19	0	23,9	0,55
23	86	81	12,8	120,5	252	7,52
24	34	39	14,2	268	18,5	0,52
25	15	20	17,2	229	119	4,00
26	90	83	11,8	162	66,7	1,70
27	50	58	16,8	17,7	143	4,80
28	38	55	17,5	94	120,5	5,40
29	64	80	30,4	299	40	1,93
35	11	27	25,1	0,6	133,8	4,26
36	90	86	26,3	44,2	81,1	1,83
37	34	43	18,6	119	27,3	0,92



V tabulce 4 můžeme vidět další naměřené výsledky jednotlivých vzorků.

*Tabulka 4 Další naměřené sledované parametry jednotlivých pacientů*

Číslo pacienta	MPV (fl)	PDW (fl)	PCT (ug/l)	Strojový poměr Ne/Ly	NLR (Ne/Ly)
1	12,4	17,1	nehod	78/14	5,6
2	nehod	nehod	nehod	75/19	3,9
3	nehod	nehod	3,46	77/11	7
4	13,6	21,6	nehod	61/26	2,4
5	nehod	nehod	nehod	21/31	0,7
6	nehod	nehod	nehod	89/4,2	21,2
7	nehod	nehod	nehod	53/38	1,39
8	nehod	nehod	nehod	69/19	3,6
9	nehod	nehod	nehod	97/2	38
10	nehod	nehod	nehod	76/14	5,4
11	nehod	nehod	nehod	54/33	1,62
12	nehod	nehod	nehod	63/23	2,7
13	nehod	nehod	nehod	73/11	6,6
14	nehod	nehod	nehod	73/15	4,9
15	11,5	15,7	nehod	41/54	0,76
16	11,8	16	nehod	40/45	0,89
17	nehod	nehod	nehod	25/51	0,12
18	11	8	nehod	14/80	0,18
19	nehod	nehod	2,51	87/4	21,7
20	13,2	20,4	nehod	44/40	11
21	nehod	nehod	1,13	ned	12,8
22	nehod	nehod	nehod	76/20	3,8
23	nehod	nehod	nehod	66/8	8
24	13	19,1	8,23	87/3	27,25
25	nehod	nehod	nehod	21/20	1,15
26	nehod	nehod	nehod	89/7	12,3
27	nehod	nehod	nehod	75/14	5,5
28	nehod	nehod	0,744	45/52	0,8
29	nehod	nehod	nehod	86/9	9,7
35	nehod	nehod	nehod	41/24	1,7
36	nehod	nehod	nehod	53/13	4
37	nehod	nehod	nehod	76/14	5,5

V tabulce 5 a 6 můžeme vidět odečtená data z krevních nátěrů jednotlivých vzorků pacientů se zhodnocením morfologie makrotrombocytů.

Tabulka 5 Odečtená data z krevních nátěrů jednotlivých pacientů

Číslo pacienta	Počet tyčí (nátěrově) (%)	Přítomnost buněk vývojových stádií
1	24	-
2	29	myelocyty, metamyelocyty
3	19	-
4	4	-
5	20	-
6	0	promyelocyty, myelocyty, 20 metamyelocytů
7	2	-
8	9	-
9	10	myelocyty, metamyelocyty
10	12	7 myelocytů, 3 metamyelocyty
11	3	-
12	1	-
13	8	-
14	3	-
15	2	-
16	2	plazmatické buňky
17	0	25 plazmatických buněk
18	1	1 plazmatická buňka, 2 metamyelocyty
19	8	1 metamyelocyt, 12 normoblastů
20	3	1 myelocyt, 1 metamyelocyt
21	8	2 myelocyty, 1 metamyelocyt
22	2	-
23	4	2 myelocyty, 1 promyelocyt
24	3	-
25	0	4 metamyelocyty
26	2	-
27	8	-
28	13	3 myelocyty, 5 metamyelocytů, 1 plazmatická buňka
29	42	-
35	1	1 myelocyt, 1 metamyelocyt, 6 normoblastů
36	10	1 metamyelocyt
37	4	3 myelocyty, 2 metamyelocyty, 6 plazmatických buněk

Tabulka 6 Zhodnocení morfologie trombocytů

Číslo pacienta	Počet makrotrombocytů (zhodnoceno mikroskopicky)
1	12 makrotrombocytů, 2 megatrombocyty
2	11 makrotrombocytů, makrotrombocyty s vakuolizací, vakuolizace tvaru krajky
3	4 střední makrotrombocyty
4	28 makrotrombocytů, makrotrombocyty slunečkového tvaru, přítomnost vakuolizace, makrotrombocyty s výběžky
5	13 makrotrombocytů, makrotrombocyty slunečkového tvaru, makrotrombocyty vakuolizované s výběžky
6	3 makrotrombocyty slunečkového tvaru, makrotrombocyty
7	10 větších trombocytů
8	19 větších trombocytů
9	2 velké trombocyty ve tvaru slunce
10	2 velké trombocyty ve tvaru slunce
11	21 větších trombocytů, výskyt megatrombocytů
12	50 větších trombocytů
13	4 velké trombocyty ve tvaru slunce, vakuolizované trombocyty
14	2 velké trombocyty ve tvaru slunce, trombocyty s periferní vakuolizací tvaru krajky
15	11 velkých trombocytů ve tvaru slunce
16	3 velké trombocyty ve tvaru slunce, makrotrombocyty s bohatou periferní vakuolizací
17	1 makrotrombocyt
18	1 velký trombocyt tvaru slunce s krajkami, 2x hypogranulocita
19	2 velké trombocyty ve tvaru slunce s bohatou vakuolizací
20	2 větší trombocyty
21	2 větší trombocyty
22	15 větších trombocytů
23	6 velkých trombocytů, megatrombocyty
24	větší granule trombocytů
25	16 velkých trombocytů s vakuolizací
26	6 větších trombocytů
27	3 megatrombocyty s vakuolizací
28	2 větší trombocyty
29	38 velkých trombocytů
35	12 megatrombocytů
36	8 větších trombocytů
37	4 velké trombocyty a hojnost megakaryocytů

## 5.2 Statistické zpracování naměřených hodnot

Jednotlivá naměřená data, určená ke statistickému zpracování (PLT-O, IPF %, CRP mg/l a RTC abs) byla zpracována statistickým programem Statistica 11 pro vyhodnocování klinických lékařských studií.

**Popisná statistika** či **statistika deskriptivní** je disciplína, která kvantitativně popisuje hlavní vlastnosti sbírky dat (výsledků měření). Snaží se stručně vystihnout podstatné informace o naměřených datech pomocí čísel nebo obrázků [41] .

Pro vytvoření popisné statistiky byl využit - medián, aritmetický průměr, minimum a maximum. Dále pro statistické zpracování byl využit – rozptyl, variační koeficient, směrodatná odchylka, dolní kvartil, horní kvartil a kvantil.

**Medián**, který značíme **Med (x)** nebo  $\tilde{x}$  je hodnota, jež vyjadřuje prostředního člena mezi hodnotami  $x_i$ , pokud jsou hodnoty uspořádány podle vzestupně seřazených výsledků [40].

**Aritmetický průměr** je statistická veličina, kterou značíme symbolem  $\bar{x}$ . Jedná se o součet všech hodnot, který je vydělený jejich počtem. Aritmetický průměr můžeme vypočítat podle níže uvedeného vzorečku, kde  $n$  značí počet všech prvků množiny  $M$  a  $x_1, x_2, \dots, x_n$  značí hodnotu znaku  $x$  [40].

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [40]$$

**Minimum**, které značíme **MIN**, je minimální hodnotou v množině hodnot [41].

**Maximum**, které značíme **MAX**, je maximální hodnotou v množině hodnot [41].

**Rozptyl** značíme  $s^2$ , vyjadřuje variabilitu rozdělení souboru náhodných hodnot kolem její střední hodnoty  $\bar{x}$ . Rozptyl můžeme vypočítat pomocí níže uvedeného vztahu, kde  $n$  označuje velikost hodnoty a  $\bar{x}$  střední hodnotu [41].

$$s^2 = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n} [40]$$

**Variační koeficient**  $v$  je definován jako podíl směrodatné odchylky  $s$  a aritmetického průměru  $\bar{x}$ . Je charakteristikou variability rozdělení pravděpodobnosti náhodné veličiny. Variační koeficient můžeme vypočítat pomocí níže uvedeného vztahu [41].

$$v = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} [40]$$

**Směrodatná odchylka** označujeme  $s$ , vyjadřuje, jak se hodnoty liší od střední hodnoty (průměrné hodnoty)  $\bar{x}$ . Směrodatnou odchylku můžeme vypočítat podle níže uvedeného vztahu, kde  $n$  je velikost hodnoty a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr [41].

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} [40]$$

**Dolní kvartil**, který se označuje  $Q_1$  je roven 25. percentilu dat, dojde tak k oddělení nejmenších 25% dat od 75 % dat nejvyšších[41].

**Horní kvartil**, který se označuje  $Q_2$  je roven 75. Percentilu, dochází tak oddělení 75% nejmenších dat od 25% dat nejvyšších[41].

**Kvantily** jsou hodnoty, které rozdělují soubor seřazených dat na několik přibližně stejně velkých částí, které mají přibližně stejný počet prvků [41].

V tabulce 7 jsou uvedeny statisticky spočtené hodnoty naměřených dat.

*Tabulka 7 Statistické zpracování naměřených hodnot pacientů*

DESKRIPTIVNÍ STATISTIKA					
Proměnná	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum
<b>PLT-O</b>	32	57,62500	56,50000	7,000000	114,0000
<b>IPF %</b>	32	20,43750	18,55000	8,900000	47,5000
<b>CRP mg/l</b>	32	76,95000	47,05000	0,000000	299,0000
<b>RET abs</b>	32	69,71875	52,00000	5,000000	252,0000

Normalita dat (proměnných) byla ověřena pomocí Shapiro-Wilk a Lillieforsova testu. Data byla zakreslena pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky (zvýrazněná červenou barvou). Dále byla normalita dat ověřena pomocí QQ grafu. QQ graf (polo nebo pravděpodobnostní) je přesnějším testem normality, kde se hodnotí kvantil "teoretické rozdělení souboru" (jak by měly výsledky vypadat). Princip této metody spočívá v tom, že na jednu osu nanášíme **kvantily hypotetického normálního rozdělení** a na druhou osu **kvantily zkoumaného souboru**. V případě normálního rozdělení leží všechny body grafu na přímce

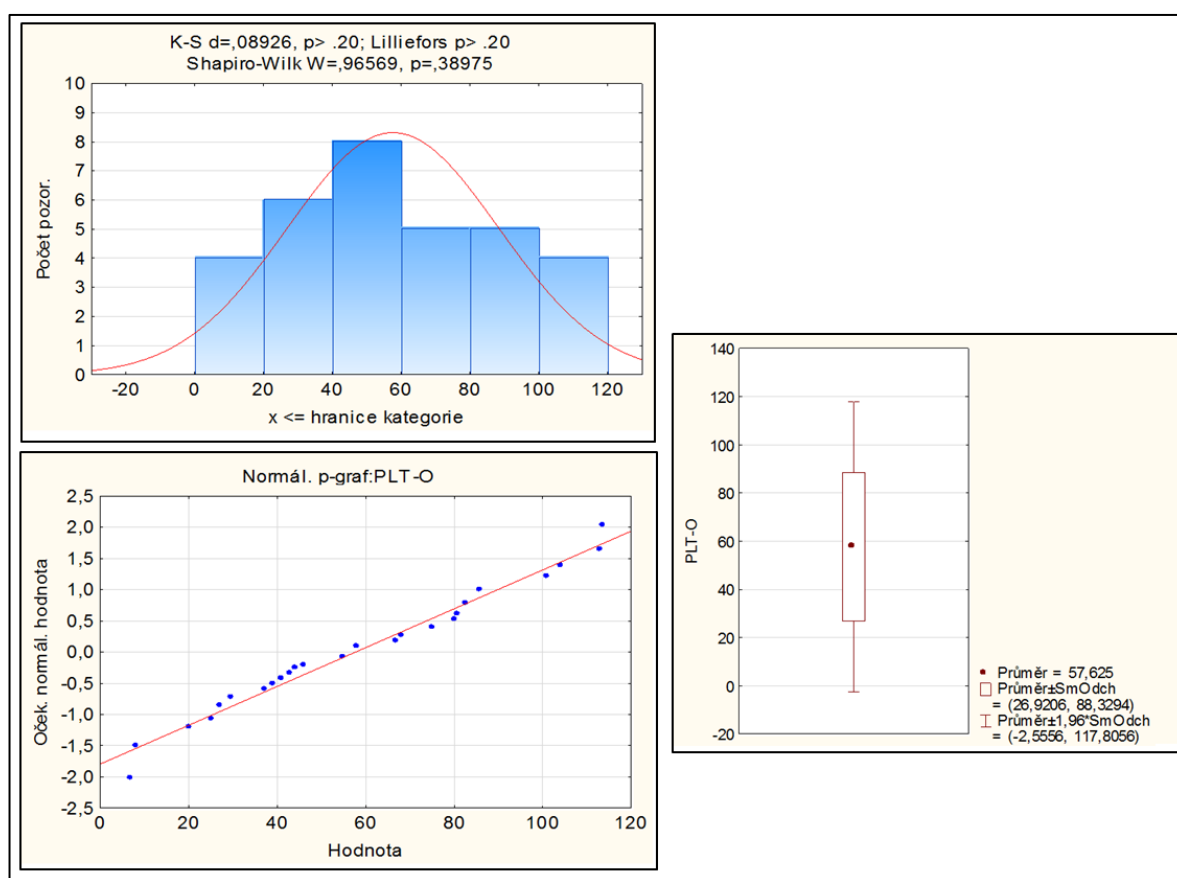
Grafy pro posouzení normality dat jsou součástí podkapitol 5.2.1 až 5.2.4.

Pro jednotlivé parametry byl vytvořen **kvartilový graf (boxplot či graf krabicový)**, znázorňující centrální tendence dat a jejich rozptýlenost. **Kvartilový graf** lze nahradit jakýmkoli jiným grafem (spojnicovým atd.). Lékařská data v klinických studiích je nutné hodnotit s  $\pm 1,96$  SD, avšak na některých pracovištích zavedeno průměr  $\pm 2$  SD [42].

Kvartilový graf je součástí podkapitol 5.2.1 až 5.2.4.

### 5.2.1 Statistické zpracování PLT-O

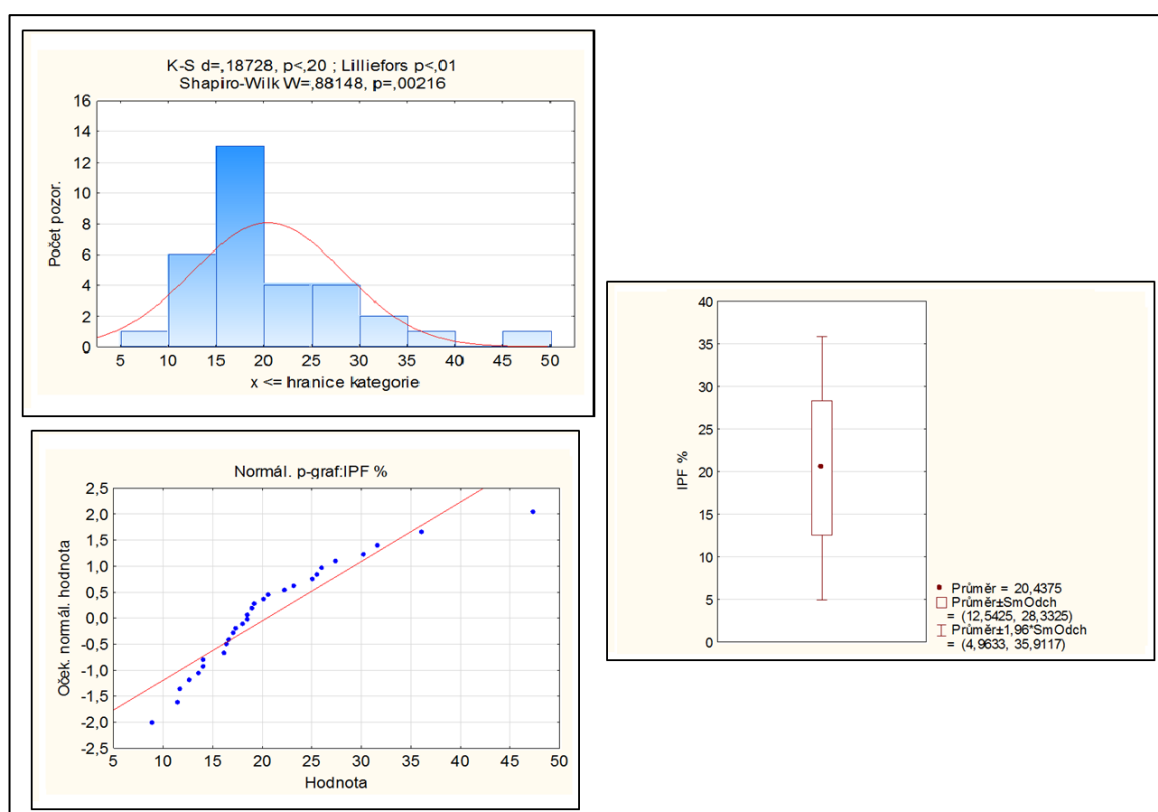
Na obrázku 24 jsou zakreslena data PLT-O u sledovaných pacientů. V levém horním rohu můžeme vidět ověření normality dat PLT-O pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V dolním levém rohu vidíme ověření normality dat PLT-O pomocí pravděpodobnostního QQ grafu. V pravé části obrázku se nachází kvartilový graf pro data PLT-O.



Obrázek 24 Výsledné grafy pro naměřená data PLT-O u sledovaných pacientů

### 5.2.2 Statistické zpracování IPF %

Na obrázku 25 jsou zakreslena data IPF% u sledovaných pacientů. V levém horním rohu můžeme vidět ověření normality dat IPF% pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V dolním levém rohu vidíme ověření normality dat IPF% pomocí pravděpodobnostního QQ grafu. V pravé části obrázku se nachází kvartilový graf pro data IPF%.

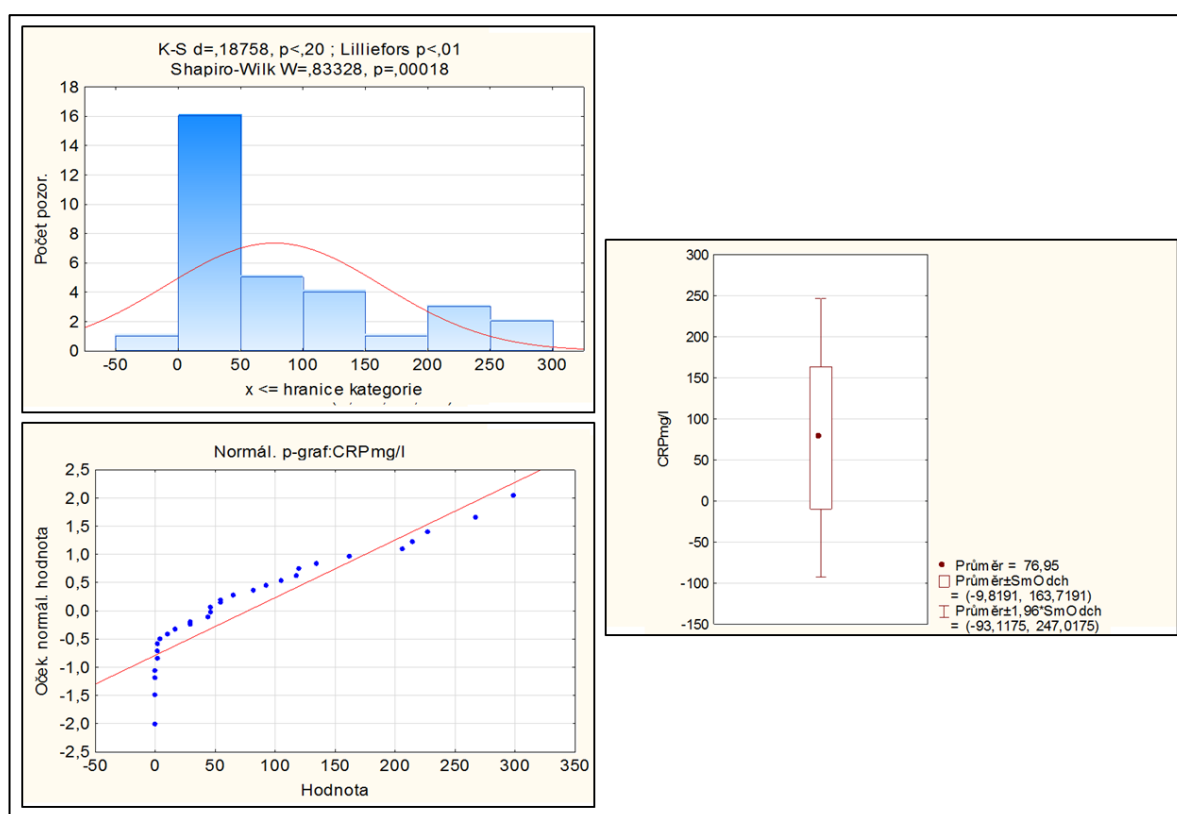


Obrázek 25 Výsledné grafy pro naměřená data IPF% u sledovaných pacientů



### 5.2.3 Statistické zpracování CRP

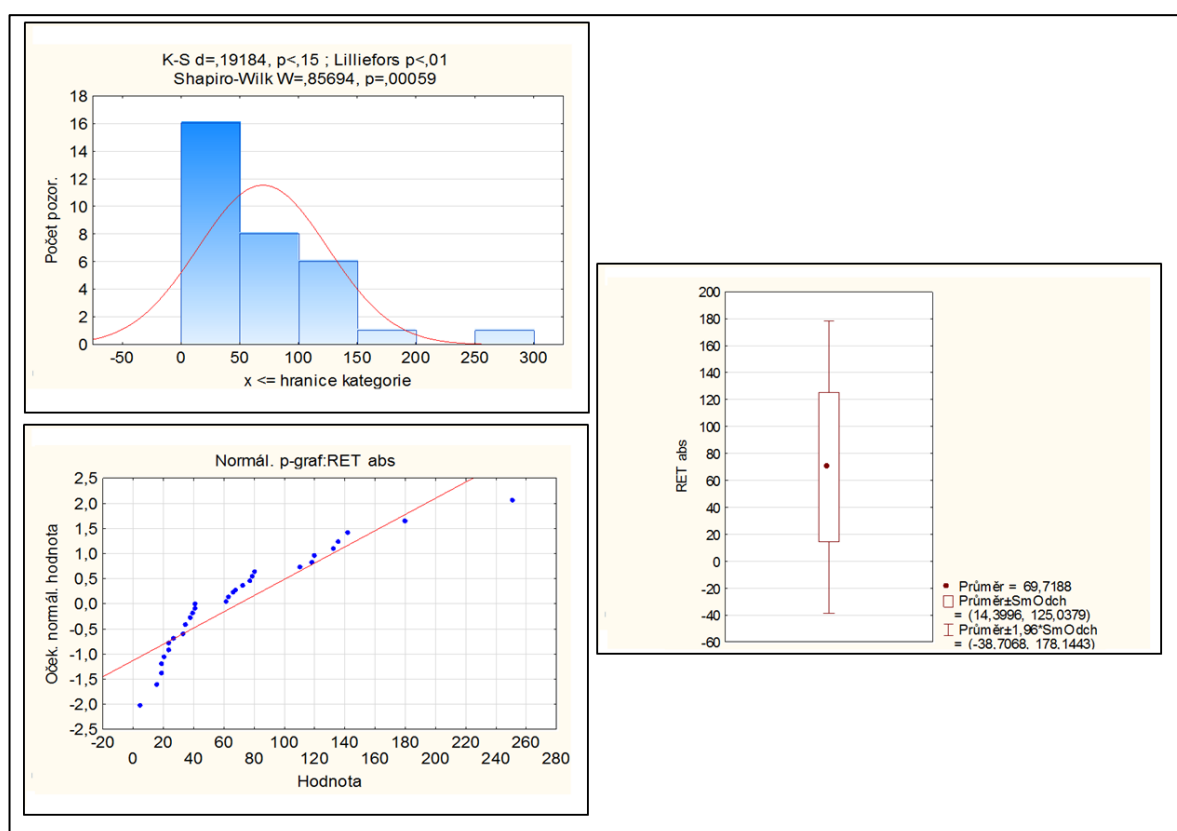
Na obrázku 26 jsou zakreslena data CRP u sledovaných pacientů. V levém horním rohu můžeme vidět ověření normality dat CRP pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V dolním levém rohu vidíme ověření normality dat CRP pomocí pravděpodobnostního QQ grafu. V pravé části obrázku se nachází kvartilový graf pro data CRP.



Obrázek 26 Výsledné grafy pro naměřená data CRP u sledovaných pacientů

## 5.2.4 Statistické zpracování RTC abs

Na obrázku 27 jsou zakreslena data RTC abs u sledovaných pacientů. V levém horním rohu můžeme vidět ověření normality dat RTC abs pomocí histogramu s proložením Gaussovy křivky. V dolním levém rohu vidíme ověření normality dat RTC abs pomocí pravděpodobnostního QQ grafu. V pravé části obrázku se nachází kvartilový graf pro data RTC abs.



Obrázek 27 Výsledné grafy pro naměřená data RTC abs u sledovaných pacientů

### 5.3 Spearmanovy korelace

Termín **korelace** popisuje vzájemný lineární vztah mezi dvěma procesy nebo veličinami  $x$  a  $y$ . Pokud se jedna veličina mění, mění se i druhá a naopak. Pokud se mezi dvěma procesy ukáže korelace, je pravděpodobné, že na sobě procesy závisejí [46].

Míru korelace určuje **korelační koeficient**  $\rho$ , který nabývá hodnot od **-1** do **+1**. Pokud je hodnota tohoto koeficientu **+1** značí zcela přímou závislost. Odpovídá-li koeficient **-1**, označuje zcela nepřímou závislost (čím se více zvětší hodnoty v jedné skupině veličin, o to více se zmenší hodnoty ve druhé skupině). Pokud se korelační koeficient rovná **0**, pak mezi znaky není žádná zjištěitelná lineární závislost [47].

**Spearmanovy korelace** se užívají k hodnocení určitých forem nelineární závislosti, k tomuto hodnocení se užívá tzv. **Spearmanův korelační koeficient** [45].

**Spearmanův korelační koeficient** značíme  $\rho$  nebo  $r_s$ , jedná se o neparametrický koeficient, který nabývá hodnot **-1** až **+1** a pracuje jen s pořadími pozorovaných hodnot. Spearmanův koeficient korelace popisuje, jak dobře odpovídá vztah veličin monotónní funkci, která může být nelineární. Hodnota spearmanova korelačního koeficientu lze odhadnout pomocí níže uvedeného vztahu, kde  $n$  značí počet všech prvků a  $p_i, q_i$  jsou pořadová čísla [45].

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n(n^2-1)} [45]$$

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_i (p_i - q_i)^2}{n(n^2-1)} [45]$$

Hodnoty kolem **0** nabývá Spearmanův korelační koeficient v případě, že pořadí hodnot  $x_i$  a  $y_i$  jsou náhodně zpřeházená a mezi sledovanými veličinami není žádný vztah. Naopak hodnot **-1** a **1** nabývá Spearmanův korelační koeficient v případě, že jedna z veličin je monotónní funkcí veličiny druhé [45].

Pro posouzení vzájemných vztahů primárních měřených parametrů jsme použili právě spearmanovy korelace, abychom dokázali nebo vyvrátili, že mezi jednotlivé parametry mohou nebo nemohou ovlivňovat parametry jiné.

### 5.3.1 Výsledné tabulky spearmanových korelací

Z tabulky 8 je jasné patrné, že spolu korelují pouze dvě námi určené proměnné (korelace je zvýrazněna červeným tučným písmem) a to: PLT-O s IPF % (hladina významnosti  $p < 0,05$ ). Zbylé proměnné spolu nekorelují.

Tabulka 8 Spearmanovy korelace pro hladinu významnosti  $p < 0,05$

SOUVISLOSTI	Spearmanovy korelace			
Proměnná	Na hladině $p < 0,05000$			
	PLT-O	IPF %	CRPmg/l	RET abs
PLT-O	1,000000	<b>-0,509526</b>	-0,174536	-0,089743
IPF %	<b>-0,509526</b>	1,000000	-0,132308	-0,199295
CRPmg/l	-0,174536	-0,132308	1,000000	0,052481
RTC abs	-0,089743	-0,199295	0,052481	1,000000

## 6 DISKUZE

Výsledky měření po statistickém vyhodnocení nám ukazují, že data byla rozložena v normě, což přispívá ke správnosti zjištěných faktů. Rozložení jednotlivých dat můžeme dohledat v kapitolách 5.2.1 až 5.2.4 v grafech na obrázcích 24-27.

Rozšířený parametr krevního obrazu IPF (frakce nezralých trombocytů), vyjadřující podíl nezralých, mladých (dříve nesprávně nazývaných retikulovaných destiček) trombocytů v periferní krvi je v odborné literatuře považován i za novodobý marker septických stavů a je nezávislým parametrem nekorelujícím vždy s CRP.

Naproti tomu odborná literatura uvádí, že jistá korelace mezi parametrem IPF%, a CRP existuje (Enz Hubert 2015). V literatuře se píše, že u pacientů se septickými stavy dochází k razantnímu nárůstu CRP i IPF%. Naše studium však žádnou známou zjistitelnou korelaci mezi CRP a IPF nepotvrdilo – k tomuto závěru jsme došli pomocí Spearmanových korelací, jejichž výsledky najdeme v kapitole 5.3.1 v tabulkách 7 a 8.

IPF% nekoreluje ani s počtem retikulocytů. Koreluje pouze s celkovým počtem destiček PLT, pokud je však zachována přiměřená trombopoéza – viz Spearmanovy korelace, vypočtené v tabulkách 7 a 8, nacházející se v kapitole 5.3.1

Ani užitečný prozánětlivý parametr Neutro/Lymfo ratio získaný z absolutních (%) hodnot strojového diferenciálu signifikantně zvýšený nad 7, 0 nekoreluje vždy s obnovou trombopoézy při vysokém IPF.

Přitom lze konstatovat, že pouze v některých případech akutních stavů a zánětů spojených s trombocytopenií a vysokým IPF jsme po rekonvalescenci pacienta obnovu trombopoézy zaznamenali.

V uvedené dostupné literatuře (např. Briggs 2004 a Takami 2007), která není zatím příliš bohatá, se setkáváme s tvrzením, že opakované signifikantně zvýšené hodnoty IPF% mohou být ve vztahu s očekávaným vzrůstem počtu destiček v periférii a svědčí o tom, že není přítomen útlum trombopoézy. Lze tedy počkat případně i s indikovaným podáním trombokoncentrátů u vysoce trombocytopenických pacientů.

Toto lze jistě přijmout v některých případech souvisejících s přítomností reaktivního stavu, s obnovou trombopoézy po chemoterapii nebo při některých typech trombotických purpur, které jsou doprovázeny destrukcí nebo konzumpcí trombocytů (Mikulenková D., O rozšířený krevní obraz by se měli zajímat i klinici - Medical Tribune 4/2013).

Otázkou zůstávají další předložené diagnózy a onemocnění, která mohou mít určitý vliv na výsledky měření a obnovu trombopoézy.

V prvním případě jsou možné obě možnosti: navýšení PLT nebo nikoliv, zcela nám nekorelovalo s CRP. Ve druhém případě většinou vysoké a rostoucí IPF nebude nutně vždy souviset se slibovaným a očekávaným zvýšením PLT, jak uvádí literatura.

Patrně bude platit opačný než v literatuře uváděný postulát: U trombocytopenické periferní krve s IPF% nižším než udávaný cut-off, jež činí 6,1 %, který udává firma Sysmex, lze pomýšlet na příčinu v selhávání kostní dřeně.

**Z toho tedy vyplývá, že při hodnotě IPF pod 6,1% nelze očekávat u vysoce trombocytopenických pacientů jakýkoliv samovolný vzrůst tvorby destiček, či obnovu trombopoézy.**

Nechávám připomínku však jen na úrovni domněnky, protože ze statistického zpracování byl použit pouze omezený soubor dat v počtu 32 měření pacientů (pro měření KO, diferenciálního rozpočtu, retikulocytů a PLT opticky). Pět vzorků (tj. více než 10%) s naměřenými kompletními výsledky měření, ve kterých vycházel parametr IPF% taktéž vysoký, bylo následně vyloučeno z důvodu nálezu shluků (vesměs to byly vzorky pacientů s pseudotrombocytopenií v prostředí EDTA) v mikroskopickém nátěru periferní krve.

Z toho vyplývá, že výsledky mého měření mohly být ovlivněny díky omezenému počtu vzorků pacientů.

## 7 ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem ověřil, že zvýšená hodnota rozšířeného parametru měření krevního obrazu IPF% souvisí s výskytem mladých, velkých destiček v periferní krvi, platí tedy zcela a vždy, vyjma neočekávaného nálezu shluků, které nelze ani měřením PLT-O v retikulocytovém kanále pomocí FC odhalit. V tomto případě je nutný kvalitativní důkaz z mikroskopického nátěru periferní krve, který byl proveden u každého vzorku.

Pro sledovaný soubor byly vybrány vzorky pacientů se zachycenou trombocytopenií (odběry většiny nejen hospitalizovaných pacientů se několikrát opakovaly) s IPF signifikantně zvýšeným - vyšším než 8 %.

Při kvantitativním zkoumání, zda nárůst IPF% nad 11 % v opakovaném odběru v čase několika týdnů bude souviset vždy s obnovou trombopoézy, data vypověděla, že nárůst IPF% nad hladinu 11% v opakovaném odběru nemusí korelovat s jednoznačnou obnovou trombopoézy.

Cíl bakalářské práce byl naplněn provedením a zhodnocením celkem 37 mikroskopických nátěrů periferní krve (po vyřazení nežádoucích vzorků jsme získali 32 mikroskopických nátěrů), kde jsme po provedení diferenciálního počtu leukocytů provedli zhodnocení morfologie destiček, co do velikosti a vzhledu - kdy byly vždy přítomny makrotrombocyty, v některých případech až megatrombocyty.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka
abs	absolutní
ADP	adenindifosfát
Ag	antigen
APS	antifosfolipidový syndrom
BFU-Meg	burst forming units – megakaryocyte
BFU-MK	burst forming units – megakaryocytic
CFU-GEMM	colony forming unit – granulocyte erythrocyte megakaryocyte macrophage
CFU-Meg	colony forming unit
CRP	C-reaktivní protein
ČHS ČLS JEP	Česká hematologická společnost-česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie (koagulace).
DIF	diferenciální rozpočet leukocytů

DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FC / FCM	průtoková cytometrie (Flow cytometry)
FSC	senzor přímého rozptylu
GP VI/IX	glykoproteinový komplex VI/IX
GP Ia/IIa/IIIa	glykoproteinový komplex Ia/IIa/IIIa
GP Ib/IIIb	glykoproteinový komplex Ib/IIIb
Hb	hemoglobin
HCT	hematokrit
HIT	heparinem indukované trombocytopenie
HSC	hematopoetická kmenová buňka
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
IPF	frakce nezralých trombocytů ( Immature Platelet Fraction)
IRF	frakce mladých retikulocytů (Immature Reticulocyte Fraction)
ITP	imunitní/ idiopatická trombocytopenická purpura
KD	kostní dřeň

K2EDTA	dvoj-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
K3EDTA	troj-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
KO	krevní obraz
LIS	laboratorní informační systém
MCV	střední objem erytrocytů
mgk	megakaryocyt
MCH	průměrná hmotnost hemoglobinu v červené krvi
MCHC	průměrná koncentrace hemoglobinu v červené krvi
MPV	střední objem trombocytu
nehod	nehodnoceno
NK	nukleová kyselina
NLR Neu/Lym	výsledek relativního počtu neutrofilů k relativnímu počtu lymfocytů
NRBC	normoblasty
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
PB	periferní krev

PDW	šíře d. t.
PKB	pluripotentní kmenová buňka
PLT	trombocyty
RBC	erytrocyty
RDW	distribuční šíře objemu erytrocytů
rel	relativní
RNA	ribonukleová kyselina
SD	Směrodatná odchylka (Standard deviation)
SFL	detektory detekující fluorescenci
SSC	senzor kolmého rozptylu
TTP	trombotická trombocytopenická purpura
TXA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
ÚVN	Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha
vWF	Von Willebrandův faktor
WBC	leukocyty

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: buňka a krevtvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2002. ISBN 80-86682-01-3.
2. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-02-1.
3. NOVOTNÝ, Ivan a Michal HRUŠKA. *Biologie člověka: [pro gymnázia]*. 4., rozš. a upr. vyd. Praha: Fortuna, 2007. ISBN 978-80-7373-007-9.
4. BOHONĚK, M. *Trombocyt*. [přednáška z předmětu-Hematologie a imunohematologie]. Praha. ÚVN. (2015-2016).
5. SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
6. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.
7. ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1025-6.
8. DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.
9. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
10. *Lidské tělo: [srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu]*. Vyd. 3., v nakl. Cesty vyd. 1. Přeložil Jaroslav HOŘEJŠÍ. Praha: Cesty, 1996. ISBN 80-7181-094-0.
11. NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.

12. LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
13. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 5. vydání. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
14. BOHONĚK, M. *Hematopoéza*. [přednáška z předmětu-Hematologie a imunohepatologie]. Praha. ÚVN. (2015-2016).
15. HRABÁNEK, J., M. BOHONĚK a A.BURICOVÁ. *Hematopoéza*. [přednáška z předmětu-Hematologie a imunohepatologie]. Praha. ÚVN. (2015-2016).
16. VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-201-9.
17. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
18. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
19. MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
20. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-86682-03-X.
21. © SYSMEX CZ. Frakce nezralých trombocytů-IPF. In: *Sysmex.cz*. [online]. [cit. 22.10.2016]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/klinicke-informace/nadstavbove-klinicke-parametry/frakce-nezralych-trombocytu-ipf.html>
22. PECKA, Miroslav. *Přehled laboratorní hematologie 2: Bílá krevní řada. Krevní destička*. [1. vyd.]. Praha: Galén, 1996. ISBN 80-85824-43-4.
23. VYDRA, Jan a Petr CETKOVSKÝ. *Hematologie v kostce*. První vydání. Praha: Mladá fronta, 2015. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3698-6.

24. PENKA, Miroslav. *Hematologie I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.
25. FRIEDMANN, Bedřich. *Hematologie v praxi*. Praha: Galén, 1994. ISBN 80-85824-05-1.
26. ADAM, P. Barvíčí metodiky. In: *Enclabmed.cz*. [online]. 15.11.2002. [cit. 26.2.2017]. Dostupné z:  
<http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/AJAWO.htm>
27. KAJEROVÁ, V., RYBÁŘ, J., SKŘIVAN, P.. Technika přípravy krevních nátěrů. In: *Projekty.sosvet.cz* [online]. Střední škola veterinární, Hradec Králové-Kukleny, 2006. [cit. 26.2.2017] Dostupné z:  
[http://projekty.sosvet.cz/2006\\_hematologie/01\\_technika.htm](http://projekty.sosvet.cz/2006_hematologie/01_technika.htm).
28. PECKA, Miroslav. *Přehled laboratorní hematologie IV*. Praha: Galén, c2000. ISBN 80-7262-076-2.
29. BÁRTOVÁ, E. Zvětšovací zařízení (lupa, světelný mikroskop). In: *Mmp.vfu.cz* [online]. 2014 [cit. 22.2.2017]. Dostupné z:  
[http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne\\_mikroskopy&lang=cz&goonpage=](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage=)
30. Sysmex Corporation. *Návod k použití SP-1000i: Hematologická automatizovaná přípravná vzorků*. Japonsko, 2009.
31. Sysmex Corporation. *Pracovní pokyny XE-500: Automatizovaný hematologický analyzátor*. Japonsko, 2008.
32. Sysmex Corporation. *XE-5000: Principy měření*. Japonsko
33. Cella Vision AB. *Příručka uživatele CellaVision*. Švédsko, 2010.
34. Roche Diagnostics GmbH. *CRPL3: C-reaktivní protein 3. generace. Informace pro objednání*. Indianapolis, 2017

35. MAŠKOVÁ, V. *Analýza krevního obrazu, základy cytologie krevních tekutin, sedimentace erytrocytů*. [přednáška z předmětu-Hematologie a imunohematologie]. Praha. ÚVN. (2015-2016).
36. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
37. VALINA, O. Nezralé krevní buňky a jejich klinický význam. In: *Klinickalaborator.cz* [online]. Kladno, 16.4.2014. [cit. 8.2.2017]. Dostupné z: [http://www.klinickalaborator.cz/upload/article\\_44/o.valinahematologie.pdf](http://www.klinickalaborator.cz/upload/article_44/o.valinahematologie.pdf)
38. Briggs C. et al. , J.Clin.Pathol. 2012Nov, 65(11):1024-30. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system.
39. Proceedings of the Sysmex European Haematology symposium 2007, p. 113 – 139, Sysmex.
40. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 3. vyd. Praha: Prometheus, c1988. ISBN 80-85849-84-4.
41. [ZPRACOVALI EMIL CALDA a Václav DUPAČ]. *Matematika pro gymnázia: kombinatorika, pravděpodobnost, statistika*. 4. upr. vyd. Praha: Prometheus, 1999. ISBN 9788071961475.
42. HENDL, Jan. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Praha: Portál, 2004. ISBN 80-717-8820-1.
43. Briggs C. et al., BrJ.Haematol.2004 Jul, 126(1): 93-9 .Assesment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral trombocytopenia.
44. Briggs.C. et al., Bone Marrow Transplant.2007 Apr, 39(8)501-7.Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation.



45. Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity. Spearmanův korelační koeficient. In: *Portal.matematickabiologie.cz*. [online]. [cit. 10.4.2017].  
Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=aplikovana-analyza-klinickych-a-biologickych-dat--analyza-a-management-dat-pro-zdravotnicke-obory--zaklady-korelacni-analyzy--spearmanuv-korelacni-koeficient>
46. Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity. Korelace.  
In: *Portal.matematickabiologie.cz*. [online]. [cit. 10.4.2017].  
Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analyza-a-modelovani-dynamickych-biologickych-dat--signaly-a-linearni-systemy--modely-velicin-spojitych-v-case-ii--3-korelace>
47. Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity. Korelační koeficient.  
In: *Portal.matematickabiologie.cz*. [online]. [cit. 10.4.2017].  
Dostupné z: <http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analyza-a-modelovani-dynamickych-biologickych-dat--signaly-a-linearni-systemy--modely-velicin-spojitych-v-case-ii--3-korelace--3-1-korelacni-koeficient>
48. MIKULENKOVÁ, D. O rozšířený krevní obraz by se měli zajímat i klinici.  
In: *Tribune.cz* [online]. 12.3.2013 [cit. 1.5.2017].  
Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/29424-o-rozsireny-krevni-obraz-by-se-meli-zajimat-i-klinici>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Rozdělení krve.....	13
Obrázek 2. Součásti plazmy.....	15
Obrázek 3 Znázornění tvarů a uspořádání krevních buněk z krevního nátěru, obarveného panoptickým barvením.....	16
Obrázek 4 Diferenciace různých druhů krvinek z kmenové buňky....	21
Obrázek 5 Obecné schéma diferenciace vznikajícího krevního elementu.....	22
Obrázek 6 Schéma primární hemostázy.....	27
Obrázek 7 Schéma vývojové řady megakaryocytu s produkcí trombocytu.....	29
Obrázek 8 Obecné schéma trombocytu.....	32
Obrázek 9 Elektronový snímek příčného řezu krevní destičky.....	32
Obrázek 10 Poruchy primární hemostázy.....	36
Obrázek 11 Přední pohled na SP-1000.....	43
Obrázek 12 Schéma impedančního měření s hydrodynamickou fokusací.....	45
Obrázek 13 Schéma fluorescenční průtokové cytometrie .....	46
Obrázek 14 Přední pohled na Sysmex XE-5000.....	47
Obrázek 15 Přední pohled na Cella Vision DM 1200 .....	49
Obrázek 16 Přední pohled na laboratorní mikroskop XC41.....	50
Obrázek 17 Popis součástí světelného mikroskopu.. .....	51
Obrázek 18 Schéma turbidimetru.....	53
Obrázek 19 Schéma zhotovení krevního nátěru.....	54
Obrázek 20 Primární výtisk vzorku z analyzátoru Sysmex XE-5000.....	57
Obrázek 21 Zhotovený krevní nátěr.....	58
Obrázek 22 Snímek morfologie trombocytů, pořízený přístrojem DM 1200 s popisem.. .....	59

Obrázek 23 Snímek zachycující trombotickou agregaci, pořízený přístrojem DM 1200 s popisem.....	60
Obrázek 24 Výsledné grafy pro naměřená data PLT-O u sledovaných pacientů.....	71
Obrázek 25 Výsledné grafy pro naměřená data IPF% u sledovaných pacientů.....	72
Obrázek 26 Výsledné grafy pro naměřená data CRP u sledovaných pacientů.....	73
Obrázek 27 Výsledné grafy pro naměřená data RTC abs u sledovaných pacientů.....	74

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Referenční hodnoty měřených parametrů .....	62
Tabulka 2 Diagnózy jednotlivých pacientů .....	63
Tabulka 3 Primární naměřené sledované parametry jednotlivých pacientů.....	64
Tabulka 4 Další naměřené sledované parametry jednotlivých pacientů.....	65
Tabulka 5 Odečtená data z krevních nátěrů jednotlivých pacientů.....	66
Tabulka 6 Zhodnocení morfologie trombocytů .....	67
Tabulka 7 Statistické zpracování naměřených hodnot pacientů .....	70
Tabulka 8 Spearmanovy korelace pro hladinu významnosti $p < 0,05$ .....	76

## 12 SEZNAM PŘÍLOH

### Obsah CD-R

- Abstrakt CZ.pdf
- Abstract EN.pdf
- Kompletní bakalářská práce.pdf
- Klíčová slova (CZ/EN).pdf
- Naskenované zadání bakalářské práce.pdf